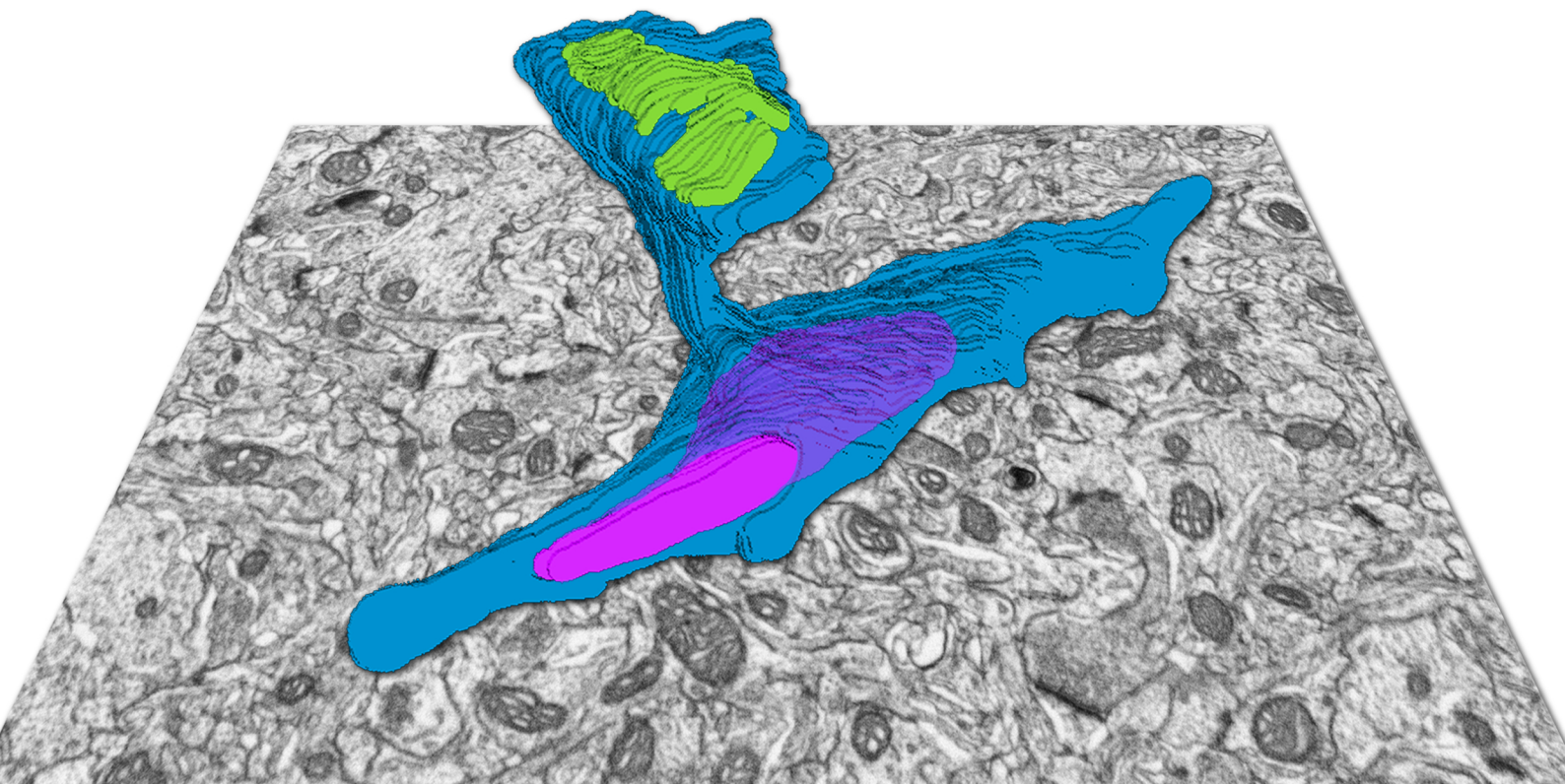


ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DE LA ULTRAESTRUCTURA DE LA CORTEZA CEREBRAL DE LA RATA

Andrea Santuy Muñoz

Tesis Doctoral
2017



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DE LA
ULTRAESTRUCTURA DE LA CORTEZA
CEREBRAL DE LA RATA**

Andrea Santuy Muñoz

Tesis Doctoral

2018

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**ESTUDIO TRIDIMENSIONAL DE LA
ULTRAESTRUCTURA DE LA CORTEZA CEREBRAL
DE LA RATA**

Memoria presentada por

Andrea Santuy Muñoz

para optar al grado de Doctora en Neurociencias.

Realizada en el Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CSIC-UPM)
bajo la dirección del Dr. Ángel Merchán Pérez y el Dr. Javier DeFelipe Oroquieta.

Fdo.: Ángel Merchán Pérez

Fdo.: Javier DeFelipe

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer esta tesis a Ángel y a Javier, que me han enseñado con paciencia a manejarme en este mundo y me han dado la oportunidad de desarrollarme como científica.

Son muchos los que componen este laboratorio y todos ellos han formado parte de esta tesis: Gracias a las dos Lidias, Isa, Rodri, Alberto, Yago, Lore, Débora, Mónica, Miriam, Carmen, Asta, Ana, Gonzalo, Silvia, Miguel y Montse; a los becarios, Alex (aunque me hayas abandonado en la recta final), Diana, Guille, Marta T, Marta D y Marta M, Mamen y Sandra; así como a todos los que han pasado por el laboratorio en algún momento. En especial quiero hacer mención a Pilar, que tanto me ha ayudado con la burocracia y el protocolo, desde luego sin ella no habría logrado ni la mitad de todo lo que alcanzado aquí; a Ruth por acogerme al principio de los tiempos y a Marta, “mi becaria”, gracias por los datos, el apoyo constante, los ánimos, las ideas, y las dendritas de cartón-piedra.

A mis compañeros de la carrera y adjuntos, Claudia, Héctor, Iris, Jose, Miriam, Raúl, Serch y Amaya. Por tantos años compartiendo biblioteca, por esas tardes infinitas de charla científica dura, si no sois vosotros no sé quién me iba a aguantar. Especialmente a Amaya, que me mantuvo con vida los tres años que vivimos juntas, las croquetas, las lentejas, las tardes paseando por Madrid y las noches de sofá y manta (sobre todo de manta). A Paloma, que apareció en el momento justo y compartió conmigo los momentos más estresantes de nuestras tesis, y Brooklin 99, y purés de verdura, y muchas dudas mitocondriales.

A todos mis compis del roco, que me han mantenido cuerda estos años. Gracias por las escapadas de fin de semana, las cenas en el bar de Carmen, y las tardes de verano buscando el 6b. Juls y Lidius, habéis sido el mayor descubrimiento que he hecho durante la tesis.

A las Teatreras. Por haber formado parte más de la mitad de mi vida, que nunca acaben las tardes de refresco y cotilleo. En especial a Marta, Gusaranapo estaría orgulloso de nosotras.

A mis compañeros del master. Por haber hecho una fiesta de los primeros años, por las discusiones eternas sobre V1 y la conciencia, y por ser un comité científico en la distancia. Nos vemos por los Congresos.

A Pablo, Irene y Valentino, por ser mi biblioteca, ayudarme con los dilemas morales y cuidarme como si fuese de la familia.

A todo el GS Phoenix. No quiero nombrar porque sois tantos que necesitaría otra tesis. No sería la misma si no hubiese crecido con vosotros, y los años que nos quedan.

Una mención especial a las Efectuosas, por tantos conciertos y festivales que me han hecho volver afónica al laboratorio.

Por último, a toda mi familia, que son muchos e imprescindibles. Especialmente a mis padres, Séfora y Juan Antonio, por haberme ayudado a llegar hasta aquí. A Elisa por ser parte de la familia. A Alba, por esos viajes inolvidables y por alimentarme en la recta final, y a Javier y David por escucharme con tanto interés y hacerme ver las cosas con nuevas perspectivas.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE

Índice de Figuras

Índice de Tablas

Resumen	5
Abreviaturas	7
I. Introducción.....	9
1. La corteza cerebral	11
1.1. Aspectos generales	11
1.2. Organización columnar	12
1.3. Capas de la corteza	12
1.4. El circuito intrínseco de la corteza	12
2. Tipos celulares presentes en la corteza	13
2.1. Neuronas piramidales	13
2.2. Interneuronas inhibitoras.....	14
2.3. Células gliales	15
3. Conectividad cortical	17
3.1. Aferencias.....	17
3.2. Eferencias	19
4. Sinapsis	19
4.1. Sinapsis químicas	19
4.1.1. Transmisión sináptica	19
4.1.2. Tipos de sinapsis químicas.....	20
4.1.3. Localización de las sinapsis.....	21
4.1.4. Composición de la densidad postsináptica	21
4.1.4.1. PSD de sinapsis excitadoras	21
4.1.4.2. PSD de sinapsis inhibitoras	22
4.1.5. Tamaño y forma de las sinapsis.....	23
4.2. Sinapsis eléctricas	23
5. Las espinas dendríticas.....	24
5.1. Aspectos generales	24
5.2. Morfología de las espinas dendríticas.....	25
5.3. Estructura de las espinas dendríticas.....	26
5.4. Función de las espinas dendríticas.....	26
5.5. Plasticidad	27
5.5.1. Modulación sensorial	27

5.5.2. Potenciación postsináptica	27
6. Las mitocondrias	28
7. Aspectos comparativos del cerebro del humano y del roedor.....	29
8. El desarrollo cortical	31
8.1. El desarrollo prenatal	31
8.2. Sinaptogénesis postnatal	31
8.3. Espinogénesis	32
 II. Objetivos	 35
 III. Materiales y Métodos	 39
1. Preparación del tejido	41
2. Microscopía electrónica tridimensional	42
3. Identificación de las sinapsis y sus dianas postsinápticas	42
4. Extracción de la superficie de aposición sináptica	44
5. Estereología de las mitocondrias.....	44
6. Análisis estadístico.....	45
 IV. Resultados	 47
1. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo	49
1.1. Distribución de sinapsis en espinas y tallos dendríticos	49
1.2. Distribución de sinapsis sobre tallos dendríticos de neuronas con y sin espinas	52
1.3. Densidad de sinapsis asimétricas y simétricas en espinas y tallos dendríticos.....	54
1.4. Espinas con múltiples sinapsis.....	54
2. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis	57
2.1. Área y perímetro de las uniones sinápticas	57
2.2. Tamaño de las uniones sinápticas en espinas y tallos dendríticos	61
2.3. Forma de las uniones sinápticas	64
3. Estudio de la distribución de mitocondrias en el neuropilo	69
3.1. Fracción de volumen mitocondrial	69
3.2. Distribución de mitocondrias en los compartimentos subcelulares.....	72
3.3. Relación de las mitocondrias y las sinapsis	72

V. Discusión	75
1. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo	77
1.1. Origen de las sinapsis del neuropilo cortical.....	77
1.2. Proporción y densidad de sinapsis asimétricas y simétricas	78
1.3. Dianas postsinápticas.....	79
1.4. Número de sinapsis por espina.....	79
1.5. Sinapsis en dendritas con y sin espinas	80
2. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis en el neuropilo	82
2.1. Métodos para estimar el tamaño de las uniones sinápticas	82
2.2. La superficie de aposición sináptica.....	83
2.3. Tamaño de las uniones sinápticas	83
2.4. Sinapsis en herradura y perforadas	84
2.5. Curvatura de la superficie de aposición sináptica	85
3. Estudio de la distribución de mitocondrias en el neuropilo.....	86
3.1. Fracción de volumen mitocondrial en la corteza somatosensorial	87
3.2. Proporción de mitocondrias en los distintos compartimentos del neuropilo y su relación con las sinapsis.....	87
4. Observaciones finales.....	89
 VI. Conclusiones	 91
 VII. Bibliografía	 95
 VIII. Anexo. Artículos de investigación	 109
Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex.....	111
Study of the size and shape of synapses in the juvenile rat somatosensory cortex with 3D electron microscopy	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de las cortezas según Von Economo	11
Figura 2	Dianas postsinápticas espinosas	13
Figura 3	Estructura de la neurona piramidal	14
Figura 4	Inervación de las interneuronas	15
Figura 5	Sinapsis tripartita	16
Figura 6	Axón mielinizado visto mediante microscopía electrónica	17
Figura 7	Proyecciones talámicas.....	18
Figura 8	Diagrama de una sinapsis eléctrica y una sinapsis química.....	20
Figura 9	Sinapsis asimétrica y simétrica vistas mediante microscopía electrónica.....	21
Figura 10	Morfología de las sinapsis.....	23
Figura 11	Espinas dendríticas en neuronas piramidales de corteza.....	24
Figura 12	Clasificación de la morfología de las espinas dendríticas	25
Figura 13	Principales elementos de una espina dendrítica	27
Figura 14	Dinámica del Ca^{2+} en una espina dendrítica.....	28
Figura 15	Mitocondria vista mediante microscopía electrónica	29
Figura 16	Modelos de espinogénesis.....	32
Figura 17	Protocolo de preparación del tejido para microscopía FIB/SEM.....	43
Figura 18	Método de Cavalieri.....	45
Figura 19	Imágenes seriadas obtenidas con FIB/SEM	50
Figura 20	Proporción de sinapsis y distribución en espinas y tallos dendríticos.....	51
Figura 21	Esquema de la distribución de sinapsis en espinas y tallos dendríticos.....	52
Figura 22	Esquema de las localizaciones de las sinapsis múltiples.....	57
Figura 23	Identificación, segmentación y extracción de la SAS	58
Figura 24	Área y perímetro de las SAS.....	60
Figura 25	Histogramas de frecuencia de las áreas de las SAS	62
Figura 26	Histogramas de frecuencia de las áreas de las SAS por capas.....	63
Figura 27	Área de las SAS en tallos y espinas dendríticas	64
Figura 28	Muestra SAS asimétricas y simétricas.....	66
Figura 29	Distribución de sinapsis de distintas morfologías.....	67
Figura 30	Curvatura de las SAS	69
Figura 31	Vm localizada en axones, dendritas y elementos no sinápticos.....	70
Figura 32	Vm localizada en axones excitadores e inhibidores	70
Figura 33	Relación entre Vm y los compartimentos del neuropilo	72
Figura 34	Correlación entre la densidad de sinapsis y la Vm	73
Figura 35	Resumen esquemático de los resultados	81
Figura 36	Mecanismos que consumen energía en las sinapsis	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Distribución de sinapsis asimétricas y simétricas en espinas y tallos dendríticos	51
Tabla 2	Tablas de contingencia	53
Tabla 3	Densidad de sinapsis asimétricas y simétricas en las seis capas de la corteza .	55
Tabla 4	Densidad de sinapsis en el neuropilo.....	56
Tabla 5	Espinas que establecen una o múltiples sinapsis.....	56
Tabla 6	Parámetros de la distribución log-normal de las áreas de las SAS	59
Tabla 7	Comparaciones pareadas de las áreas y perímetros de las SAS	61
Tabla 8	Parámetros de la distribución log-normal de los perímetros de SAS	63
Tabla 9	Área de las SAS asimétricas y simétricas localizadas espinas y tallos dendríticos	65
Tabla 10	Área, perímetro y curvatura de SAS maculares, perforadas y en herradura	68
Tabla 11	Parámetros de las distribuciones log-normales de SAS maculares, perforadas y en herradura	68
Tabla 12	Media de la fracción de volumen mitocondrial	71
Tabla 13	Comparaciones pareadas de la Vm en las seis capas de la corteza	71
Tabla 14	Fracción de volumen mitocondrial localizada en neuritas	71
Tabla 15	Fracción de volumen de dendritas, axones y elementos no sinápticos	73

RESUMEN

El objetivo de la presente tesis doctoral es contribuir al conocimiento de la microanatomía de la corteza cerebral. En concreto, hemos estudiado la distribución, forma y tamaño de las sinapsis, así como de las mitocondrias presentes en el neuropilo de la corteza somatosensorial de la rata. Para llevar a cabo este estudio se han utilizado técnicas de microscopía electrónica tridimensional y técnicas estereológicas.

El neuropilo es la región de la corteza cerebral dónde se establecen la mayoría de las conexiones sinápticas. Estas conexiones se dan entre axones, que pueden ser excitadores o inhibidores, y dendritas. En numerosas ocasiones las dendritas presentan protuberancias de la membrana en forma de espinas, siendo éstas el principal elemento postsináptico de las sinapsis excitadoras. En la presente tesis hemos analizado la densidad y distribución de las sinapsis en el neuropilo de la corteza somatosensorial primaria de la rata de catorce días de edad postnatal. Nuestros resultados indican que las sinapsis asimétricas superan numéricamente a las simétricas en una proporción de 9:1, y que tanto las sinapsis asimétricas como las simétricas son más numerosas en la capa IV y menos numerosas en la capa VI. Hemos estudiado también la localización de estas sinapsis en tallos y espinas dendríticas, observando que las sinapsis en espinas superan a las sinapsis en tallos dendríticos en una proporción de 8:2. De esta manera la mayoría de las sinapsis en el neuropilo son asimétricas en espinas, seguidas de asimétricas en tallos dendríticos, simétricas en tallos y por último simétricas en espinas.

Dada la relación entre la estructura y la función de las sinapsis, hemos estudiado el tamaño y la forma de las uniones sinápticas. Al igual que otros parámetros, como la fuerza sináptica o la amplitud de los potenciales postsinápticos, la distribución de los tamaños de las uniones sinápticas se ajusta a una distribución log-normal. Nuestros resultados ponen de manifiesto que las uniones sinápticas asimétricas son, en promedio, más pequeñas que las simétricas en todas las capas corticales. En ambos casos las más grandes se encuentran en la capa III y las más pequeñas en la capa IV. La mayoría de las sinapsis corticales tienen una densidad postsináptica de forma discoidal o macular, no obstante, un pequeño porcentaje presenta perforaciones o un perímetro en forma de herradura. Las sinapsis perforadas y en herradura son, de media, más grandes que las maculares, aunque no está claro que pertenezcan a distintas poblaciones de sinapsis. En nuestro estudio hemos encontrado además que la curvatura de las uniones sinápticas es mayor para las sinapsis simétricas que para las asimétricas, aunque no hay correlación entre la curvatura y el área de las uniones sinápticas.

Por último, en esta tesis hemos analizado la densidad de mitocondrias en el neuropilo, su distribución en axones y dendritas, y su relación con las sinapsis, dado que el cerebro tiene un consumo metabólico muy elevado, en gran parte debido a la actividad sináptica. La mayor fracción de volumen mitocondrial se encuentra en la capa IV y la menor en las capas I y VI. Las dendritas tienen más mitocondrias que los axones, lo que probablemente está relacionado con un mayor consumo energético a nivel postsináptico. En el caso de los axones, pese a que globalmente hay más mitocondrias localizadas en axones excitadores que en inhibidores, los inhibidores tienen mayor proporción de mitocondrias. Hemos encontrado, además, una correlación entre la densidad de sinapsis en el neuropilo y la fracción de volumen mitocondrial.

Uno de los primeros pasos para comprender la organización funcional del cerebro es conocer su diseño estructural, y correlacionarlo con las características moleculares y fisiológicas de las células estudiadas. De este modo, los resultados aquí presentados ayudarán a entender mejor la estructura de los microcircuitos, a describir el sinaptoma y a construir modelos corticales más realistas.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aparato de espina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPA	Receptor de AMPA
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
CA	Asta de Ammon
CE	Coeficiente de Error
CV	Coeficiente de Variación
EPSP	Potencial postsináptico excitador
FIB	Haz de iones de Galio, por sus siglas en inglés <i>Focused Ion Beam</i>
GABA	Ácido γ -amino butírico
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
IP ₃	Inositol trifosfato
IP ₃ R	Receptor de IP ₃
KW	Test de Kruskal- Wallis
LTP	Potenciación a largo plazo, por sus siglas en inglés <i>Long Term Potentiation</i>
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MW	Test de Mann- Whitney
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de NMDA
P	Postnatal
PB	Tampón fosfato, por sus siglas en inglés <i>Phosphate Buffer</i>
PSD	Densidad postsináptica, por sus siglas en inglés <i>Post Synaptic Density</i>
RyR	Receptor de rianodina
SA	Sinapsis asimétrica
SAS	Superficie de aposición sináptica
sem	Error estándar de la media, por sus siglas en inglés <i>Standard Error of the Mean</i>
SEM	Microscopio electrónico de barrido, por sus siglas en inglés <i>Scanning Electron Micorscope</i>
SNC	Sistema nervioso central
SS	Sinapsis simétrica
Vm	Fracción de volumen mitocondrial

I. INTRODUCCIÓN

1. La corteza cerebral

1.1. Aspectos generales

La corteza cerebral es una estructura laminar que, junto con los núcleos basales y la amígdala, forma el telencéfalo. Se localiza en la parte más rostral del encéfalo envolviendo al diencefalo. Está presente en todos los vertebrados con distinto grado de complejidad y desarrollo. En secciones teñidas con el método de Nissl (que colorea los cuerpos celulares de las neuronas y de las células gliales) se distinguen tres tipos morfológicos de corteza cerebral: isocorteza, alo corteza y mesocorteza. La isocorteza tiene hasta 6 capas y es característica de la neocorteza. La alo corteza es más delgada, contiene típicamente 3 capas y es propia de la paleocorteza y arquicorteza. La mesocorteza (también llamada perialocorteza o corteza paralímbica) representa una corteza de transición entre alo corteza e isocorteza, con características intermedias entre éstas dos, se localiza en el giro parahipocámpico y en la corteza cingular.

La neocorteza no es uniforme en toda su extensión sino que se reconocen diversas áreas corticales. Éstas difieren en el espesor, la morfología, la densidad neuronal de las capas y la organización de las fibras mielínicas. Sin embargo, la identificación de áreas corticales no es una tarea fácil. Con la excepción de ciertas áreas, como la corteza motora primaria y la corteza visual primaria, la mayoría de las áreas corticales son difíciles de clasificar. Así, por ejemplo, Walter Campbell (1868-1937) distinguía alrededor de 20 áreas, mientras que para Korbinian Brodmann (1868-1918) había 47. Otros autores, como Constantin Von Economo (1876-1931) y Cécile Mugnier Vogt, (1875-1962) y Oskar Vogt (1870-1959) describieron 109 o más de 200 áreas,

respectivamente (Brodmann y Gary 2006, Kemper y Galaburda 1984). Más recientemente, Glasser *et al.* (2016) propusieron un nuevo mapa cortical del cerebro humano que contiene 180 áreas por hemisferio para lo cual utilizaron, no solo criterios anatómicos, sino también funcionales, de conectividad y topográficos. En el caso de la rata, la clasificación de las áreas corticales más extendida es la de Paxinos y Watson (2007), que parcela el cerebro completo basándose en criterios citoarquitectónicos.

Según Von Economo (1929), existen cinco tipos fundamentales de textura neocortical que se distinguen principalmente por la densidad de las células granulares (células pequeñas con un soma ovalado o esférico) y la densidad y el tamaño de las células piramidales. Son: 1, *agranular*; 2, *frontal*; 3, *parietal*; 4, *polar*; 5, *granular* (Figura 1) (Triarhou 2006). Los tipos 2,

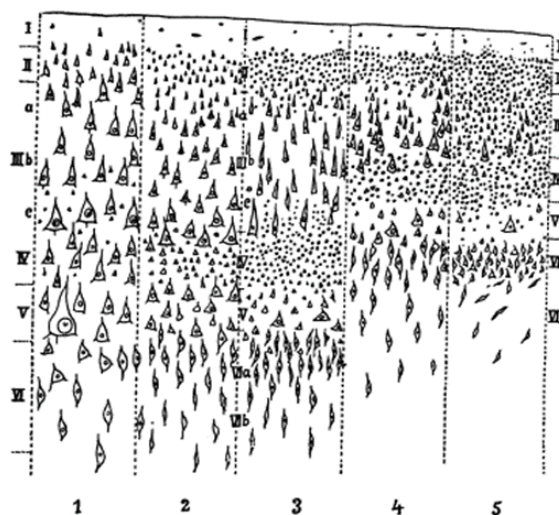


Figura 1. Clasificación de los tipos de cortezas según Von Economo. En función de la proporción de células piramidales y granulares las cortezas se dividen en: 1, agranular; 2, frontal; 3, parietal; 4, polar y 5, granular (Triarhou 2006).

3 y 4 constituyen la mayor parte de la neocorteza y se distinguen con facilidad seis capas corticales. El tipo 1 o agranular es típico de la corteza motora y se caracteriza por la escasez de células granulares. El tipo 5 o granular (también conocido como *coniocorteza*) se caracteriza por la gran densidad de células granulares y está representado fundamentalmente por la corteza visual primaria.

1.2 Organización columnar

La corteza no está organizada únicamente en capas paralelas a la superficie. Entre 1933 y 1938, Lorente de Nó introdujo el concepto de “unidad cortical elemental de operación” con el que propuso que la corteza está formada por pequeños cilindros compuestos por cadenas verticales de neuronas (revisado en DeFelipe *et al.* 2012). Esta teoría fue ampliamente desarrollada por Mountcastle (1997), quien definió las columnas corticales como grupos de neuronas que interaccionan sinápticamente, distribuidas a lo largo de las capas II-VI. Denominó minicolumna a la unidad básica de organización vertical. En primates, cada minicolumna posee entre 80 y 100 neuronas y la mayoría de los fenotipos neuronales presentes en la corteza. Varias minicolumnas se asocian en macrocolumnas mediante conexiones sinápticas horizontales. No obstante, el término “columna” se usa como sinónimo de “macrocolumna”.

Pese a la gran variabilidad en el tamaño del cerebro que hay entre especies, el grosor de la corteza se mantiene relativamente constante, de modo que el aumento de volumen cortical implica un mayor número de columnas (DeFelipe 2011).

1.3 Capas de la corteza

El presente estudio se centra en la corteza somatosensorial primaria de la rata. Se trata de

un tipo de neocorteza homotípica compuesta por seis capas paralelas a la superficie pial, de más externa a más interna se diferencian en (Kirkcaldie 2012):

Capa I: Compuesta principalmente por axones, dendritas y prolongaciones gliales. Se caracteriza por la escasez de somas neuronales.

Capa II: Posee una gran densidad de neuronas piramidales pequeñas.

Capa III: Con neuronas piramidales de mayor tamaño.

Capa IV: Es rica en células estrelladas.

Capa V: Posee las neuronas piramidales más grandes.

Capa VI: Presenta un gran número de células piramidales polimórficas.

En roedores, la corteza somatosensorial primaria presenta una organización somatotópica, es decir, hay una representación de la superficie corporal en la corteza. Se trata de un mapa invertido en el que las patas son mediales, las vibrisas caudolaterales y las mandíbulas rostralaterales. Además, cada vibrisa está representada en zonas especializadas de la corteza, denominadas barriles (Paxinos 2004).

1.4 El circuito intrínseco de la corteza

El principio general que rige el circuito intrínseco de la corteza es que el flujo de excitación dentro de una columna cortical es prácticamente unidireccional (Thomson y Lamy 2007): la información sensorial talámica llega a la capa IV cuyas neuronas a su vez proyectan a las capas II/III. De aquí, la información fluye hacia la capa V, cuyas neuronas proyectan a la capa VI. Finalmente el circuito se cierra con la proyección desde la capa VI a la capa IV (Douglas y Martin 2004, Schubert *et al.* 2007)

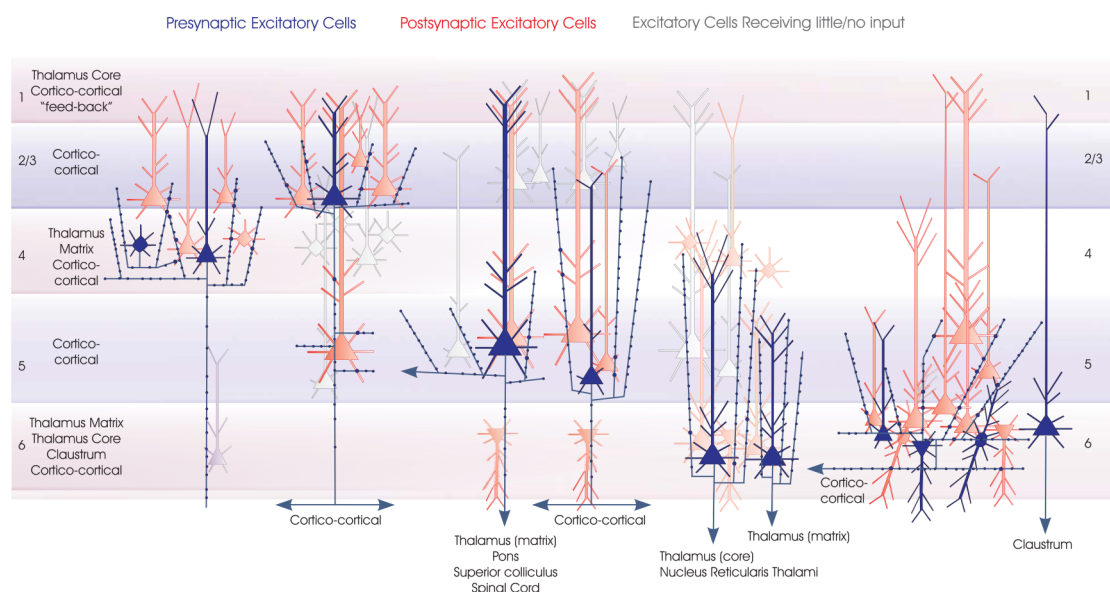


Figura 2. Conectividad de las neuronas piramidales y estrelladas. Las células rojas representan aquellas que reciben excitación de las neuronas presinápticas (en azul). El color rojo pálido señala las células que reciben aferencias débiles, el color morado indica que los datos son insuficientes para determinar la identidad de las células. Las células blancas no han mostrado respuesta a la activación del axón correspondiente (Thomson y Lamy 2007).

(Figura 2). También existen proyecciones excitadoras en sentido inverso (de capa V a III y a IV) pero son relativamente débiles (Thomson y Lamy 2007).

2. Tipos celulares presentes en la corteza

La corteza cerebral está formada por los siguientes elementos principales: neuronas de proyección, interneuronas, glía (astrocitos, oligodendrocitos y microglía), fibras nerviosas y vasos sanguíneos. Se conoce como neuropilo a aquellas partes del tejido cortical en las que únicamente hay dendritas, axones y prolongaciones gliales, excluyendo los somas celulares y los vasos sanguíneos.

2.1 Neuronas piramidales

Las neuronas piramidales representan las principales células de proyección de la corteza cerebral. Se trata de las neuronas más

abundantes de la corteza, suponen entre el 70% y el 85% de la totalidad (DeFelipe 2011, DeFelipe y Fariñas 1992), y se encuentran en todas las capas corticales salvo en la I. Son neuronas excitadoras que utilizan glutamato (Glu) como neurotransmisor. Estructuralmente se caracterizan por tener un soma relativamente grande, de forma piramidal, de cuyo vértice superior parte una dendrita apical gruesa (Figura 3). Esta dendrita se dirige hacia capas más superficiales, donde termina en un penacho, en numerosas ocasiones en la capa I. A lo largo de la trayectoria ascendente de la dendrita apical, ésta emite colaterales con una distribución oblicua y cuya complejidad varía dependiendo del tipo de célula piramidal. De la zona basal del soma parten radialmente las dendritas basales, con dirección horizontal o hacia capas más profundas. Todas las arborizaciones dendríticas están recubiertas por pequeñas protuberancias llamadas espinas dendríticas, que se describirán más adelante (véase Epígrafe 5. Las espinas dendríticas).

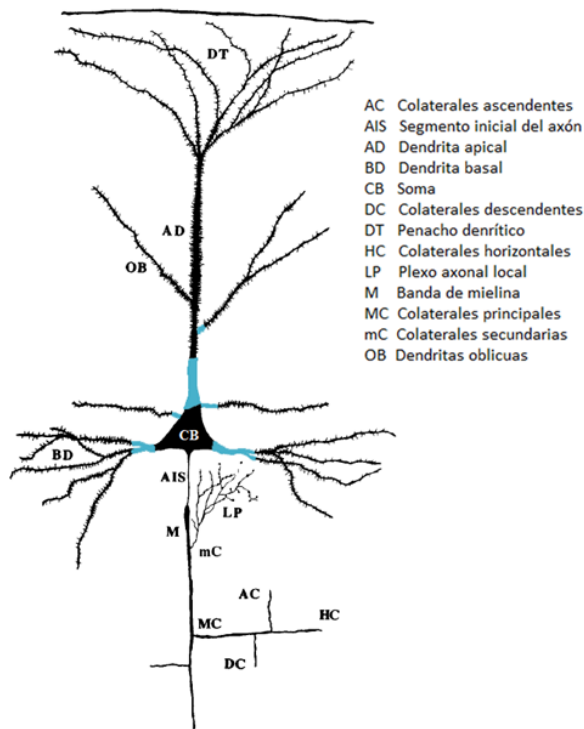


Figura 3. Estructura de una neurona piramidal típica. Las zonas sombreadas en azul señalan los segmentos dendríticos libres de espinas. Modificado de DeFelipe y Fariñas (1992).

También de la zona basal del soma surge el axón, que cursa verticalmente hacia la sustancia blanca para alcanzar otras zonas corticales o subcorticales. Estos axones no son exclusivamente de proyección, puesto que en su recorrido dejan numerosas colaterales que se integran en circuitos locales.

No obstante, las neuronas piramidales en ocasiones no se ajustan a la estructura típica aquí descrita. Por ejemplo, las hay con varias dendritas apicales, o invertidas de manera que la dendrita apical se dirige hacia zonas más profundas, o células piramidales prácticamente carentes de espinas. También existen ejemplos de células piramidales con axones de proyección que no se ramifican o con axones que no salen de la corteza (para una revisión de la estructura de las neuronas piramidales véase DeFelipe 2015a, DeFelipe y Fariñas 1992).

Markram *et al.* (2015) hicieron una clasificación de tipos neuronales excitadores de la corteza somatosensorial de la rata juvenil, clasificando dichas neuronas en 11 tipos morfológicos, que se convierten en 13 al considerar diferencias entre capas. Se trata de un modelo simplificado al que habría que añadir otros tipos celulares de la capa VI como las pirámides horizontales o las pirámides de la capa VIb.

La capa IV, además de neuronas piramidales típicas, presenta pirámides estrelladas (con una dendrita apical carente de penacho) y neuronas estrelladas (Markram *et al.* 2015, Staiger *et al.* 2004). Las neuronas estrelladas son células multipolares excitadoras de axón corto cuyas dendritas se ramifican en todas direcciones. Son abundantes en la capa IV de las regiones somatosensoriales, reciben aferencias talámicas y proyectan a las capas II y III.

2.2 Interneuronas inhibitorias

Las neuronas de axón corto, llamadas interneuronas, suponen entre el 15 y el 30% de las neuronas de corteza. La mayoría de las interneuronas son de naturaleza inhibitoria, al utilizar ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor. Suponen la mayor fuente de inhibición en la corteza. Se trata de neuronas cuyo axón se ramifica localmente, y cuyas dendritas carecen de espinas o presentan muy pocas. Hay gran variedad de interneuronas inhibitorias con distintas propiedades morfológicas, moleculares y fisiológicas (Jiang *et al.* 2015, Markram *et al.* 2004), la Terminología de Petilla propone una clasificación basada en estos tres criterios que ha sido ampliamente aceptado por la comunidad científica (Ascoli *et al.* 2008). Markram *et al.* (2015) describieron 15 tipos morfológicos distintos que se convierten en 42 si se tienen en cuenta las diferencias entre las seis capas de la corteza somatosensorial de la

rata joven. La combinación de las características morfológicas y eléctricas, así como bioquímicas, multiplica aún más la diversidad de tipos neuronales.

De especial interés es que distintos tipos de interneuronas inervan distintas regiones de otras neuronas (DeFelipe *et al.* 2007, Markram *et al.* 2004). Según el destino de sus proyecciones se pueden encontrar cuatro tipos de interneuronas:

- i. axo-dendríticas: células que establecen sinapsis únicamente con dendritas (como las células *double bouquet*).
- ii. axo-dendrosomáticas: células que forman sinapsis tanto con dendritas como con el soma, pero preferentemente con dendritas (como las neuronas neurogliaformes).
- iii. axo-somatodendríticas: células que forman sinapsis tanto con dendritas como con el soma, pero preferentemente con el soma (como las células en cesto).
- iv. axo-axónicas o células en candelabro: células que forman sinapsis únicamente con el segmento inicial del axón.

Salvo las células en candelabro, que sólo contactan con células piramidales, todas las demás interneuronas inhibitorias establecen sinapsis tanto con las neuronas piramidales como con otras interneuronas (Figura 4) (DeFelipe *et al.* 2007).

2.3 Células gliales

Tradicionalmente, las células gliales se han considerado células de soporte para las neuronas, sin embargo, sus funciones van mucho más allá. En el sistema nervioso central (SNC) se encuentran varios tipos de células gliales, que pueden ser de origen ectodérmico (astrocitos, oligodendrocitos, y células ependimales) o de origen mesodérmico (microglía). La proporción de células gliales en el cerebro es aún un tema en discusión. Clásicamente se ha aceptado que la glía supera numéricamente a las neuronas en proporciones de 10:1, o incluso 50:1 (Kandel *et al.* 2000), siendo estos valores muy variables en distintas regiones y especies (Cheung *et al.* 2007). No obstante, estudios basados en nuevas metodologías, defienden que la proporción es relativamente constante y aproximadamente 1:1 en todas las áreas y especies (véase Hilgetag y Barbas (2009) para una revisión del tema).

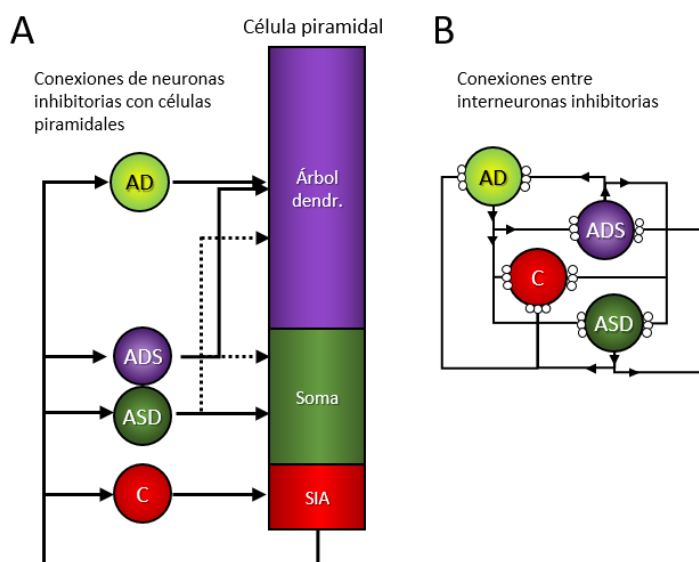


Figura 4. (A) Ilustración de las relaciones sinápticas entre interneuronas y neuronas piramidales. Se identifican cuatro grupos de interneuronas inhibitorias: axo-dendríticas (AD), axo-dendrosomáticas (ADS), axo-somatodendríticas (ASD) y axo-axónicas o en candelabro (C). SIA, Segmento inicial del axón. **(B)** Ilustración de las conexiones entre interneuronas. Todas las interneuronas contactan con otras interneuronas, salvo las interneuronas en candelabro, que sólo contactan con neuronas piramidales. Por simplicidad, las conexiones entre los mismos tipos celulares no han sido incluidas. Modificado de DeFelipe *et al.* (2007).

Los **astrocitos** son el tipo glial más abundante en el SNC, se dividen en numerosos subtipos, siendo los más comunes los astrocitos protoplásmicos y fibrosos, y la glía radial. En la corteza cerebral los más frecuentes son los astrocitos protoplásmicos, éstos poseen muchas prolongaciones de gran complejidad que contactan por un lado con los vasos sanguíneos y por otro con las prolongaciones neuronas. Los astrocitos fibrosos son más frecuentes en la sustancia blanca. La glía radial hace referencia a células bipolares que contactan con la pared ventricular y con la superficie pial, son muy comunes durante el desarrollo, donde actúan como guía para la migración radial de las neuronas (Verkhratsky y Butt 2007).

Los astrocitos tienen un papel fundamental en el soporte energético de las neuronas, puesto que éstas no acumulan glucógeno. Los astrocitos generan lactato que es transportado hacia las neuronas, donde es transformado en piruvato para entrar en el ciclo de Krebs y así generar ATP dentro de las mitocondrias.

Pese a que no son eléctricamente excitables, los astrocitos presentan corrientes de calcio (Ca^{2+}) que son transmitidas de unos a otros en forma de ondas de Ca^{2+} intracelulares. La liberación de neurotransmisor a la hendidura sináptica por parte de los axones activa receptores de Glu en los astrocitos, causando el aumento de Ca^{2+} intracelular en el citoplasma astrocitario (Eroglu y Barres 2010). En respuesta al incremento del Ca^{2+} intracelular, el astrocito libera sustancias como Glu, serina, ATP, adenosina, GABA y otros muchos compuestos que modulan la transmisión sináptica. Además, están implicados en la modulación de la excitabilidad neuronal, así como en la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés, *Long Term Potentiation*). Por tanto parece que los astrocitos tienen también un papel fundamental en el procesamiento y almacenaje

de información y que éstas funciones no son exclusivas de las neuronas como se ha considerado tradicionalmente (Perea y Araque 2010). Todas estas vías de comunicación entre astrocitos y neuronas han llevado a crear el concepto de “sinapsis tripartita”, donde se enfatiza que las sinapsis están formadas tanto por los elementos neuronales pre y postsináptico como por los astrocitos adyacentes (Araque *et al.* 1999) (Figura 5).

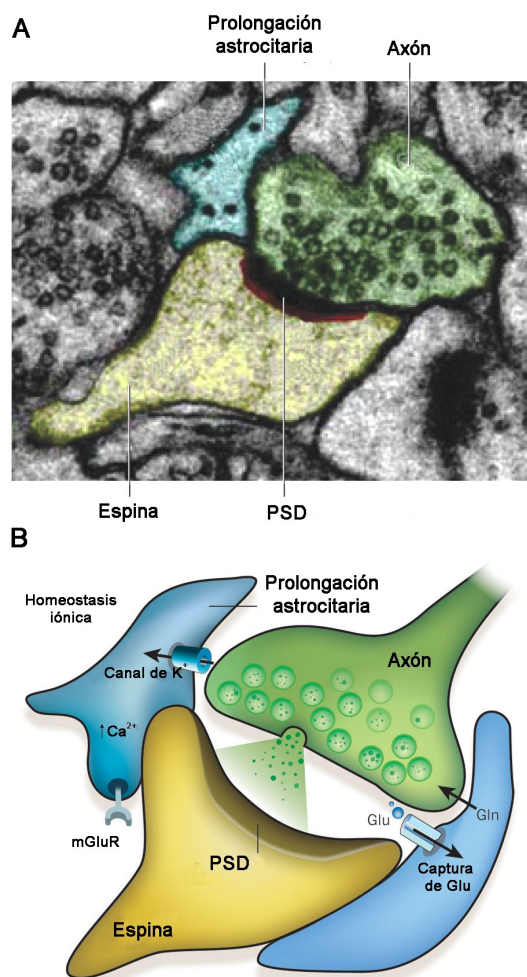


Figura 5. (A) Imagen de microscopía electrónica mostrando una sinapsis tripartita en el hipocampo: el astrocito (azul) rodea el área perisináptica. El axón (verde) hace sinapsis con una espina dendrítica (amarillo), la densidad postsináptica (PSD) se muestra en rojo. **(B)** Representación esquemática de una sinapsis tripartita. Modificado de Eroglu y Barres (2010).

Los **oligodendrocitos** emiten prolongaciones ricas en mielina que envuelven los axones del SNC para aislarlos y así facilitar la propagación de los potenciales de acción. Con el microscopio electrónico las membranas ricas en mielina se pueden ver como engrosamientos altamente electrodensos (Figura 6).

La **microglía** tiene un origen embrionario distinto al resto de células gliales. Se trata células mesodérmicas con capacidad fagocítica que forman el sistema inmune del SNC. En estado de reposo las células microgliales tienen prolongaciones muy dinámicas que exploran el microambiente en busca de cambios en la homeostasis, aunque también se ha descrito su papel en el control de la función sináptica (para una revisión véase Prinz *et al.* 2011). Ante una alteración en el medio, la microglía se activa: cambia su morfología, elimina los restos celulares, produce factores neuroprotectores y participa en procesos de restauración como angiogénesis y oligodendrogénesis (Loane y Kumar 2016).

3. Conectividad cortical

3.1 Aferencias

La corteza recibe aferencias tanto de otras zonas de la corteza como de zonas

subcorticales. En la corteza somatosensorial primaria del roedor la mayoría de las aferencias provienen de los núcleos talámicos de relevo ventral posteromedial y ventral posterolateral, cuyos axones llegan preferentemente a la capa IV. Se trata de fibras procedentes de neuronas tipo C, también llamadas específicas o lemniscales. No obstante, pese a que éste es el tipo neuronal predominante en los núcleos sensoriales, el tálamo también proyecta desde otros núcleos como el núcleo posterior, el ventrolateral y el ventromedial que poseen mayoritariamente neuronas tipo M (tanto focales como multiárea), que proyectan de forma divergente a las capas I, III y Va. Por último, las neuronas tipo IL de los núcleos intralaminares también proyectan a la corteza somatosensorial, concretamente a las capas Va y VI (Clasca *et al.* 2012) (Figura 7).

Pese a que la gran mayoría de las aferencias subcorticales provienen del tálamo, hay otras regiones que también proyectan a la corteza somatosensorial, como pueden ser los núcleos del rafe, que envían aferencias serotoninérgicas, el locus coeruleus, que envía fibras noradrenérgicas, el núcleo basal de Meynert que envía fibras colinérgicas y la zona incerta (Paxinos 2004).

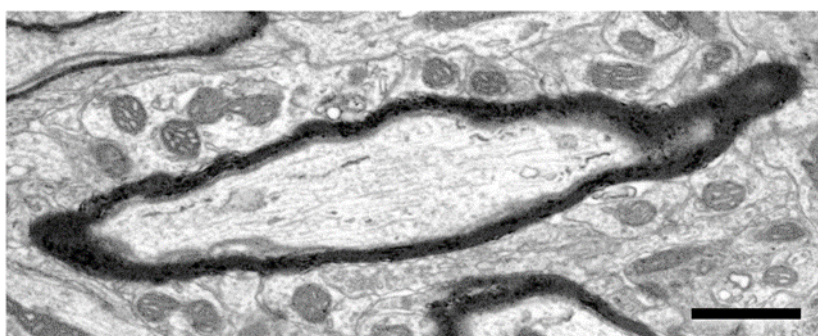


Figura 6. Axón mielinizado visto mediante microscopía electrónica. La membrana del oligodendrocito se enrolla alrededor del axón formando la vaina de mielina, de aspecto electrodenso. Barra de escala = 400nm.

3.2 Eferencias

La corteza somatosensorial primaria proyecta a otras regiones de la corteza, así como a estructuras subcorticales:

Las conexiones con otras regiones corticales pueden ser intra e interhemisféricas. La corteza somatosensorial primaria tiene conexiones recíprocas con la corteza motora primaria y la corteza somatosensorial secundaria. Las fibras callosas, que conectan ambos hemisferios, se originan en las capas III y V y, en la rata, terminan predominantemente en las mismas capas contralaterales (Akers y Killackey 1978, Thomson y Lamy 2007).

En cuanto a proyecciones hacia regiones subcorticales, se han descrito conexiones recíprocas con los núcleos talámicos, proyectando especialmente a los núcleos ventroposterior lateral y medial, y mandando proyecciones somatotópicas al núcleo reticular del tálamo (Künzle 1977). Las neuronas que proyectan al tálamo se localizan en las capas V y VI. Además, la corteza somatosensorial primaria proyecta al caudado-putamen ipsilateral (Paxinos 2004). En concreto, la sección dorsolateral del estriado recibe aferencias tanto de áreas motoras y premotoras como de la corteza somatosensorial, siguiendo estas una organización somatotópica (Haber 2016). Las proyecciones a los núcleos de la columna dorsal (gracilis y cuneatus) se han estudiado en varias especies de mamíferos, poniendo de manifiesto que las proyecciones de la corteza somatosensorial primaria son principalmente contralaterales y se originan en la capa V. Distintos grupos neuronales proyectan también al núcleo tálamo, al núcleo Z, a la formación reticular bulbar y a la médula espinal (Catsman-Berrevoets y Kuypers 1976, Weisberg y Rustioni 1979). La corteza somatosensorial primaria proyecta a los núcleos pontinos ipsilaterales, y

estos proyectan al cerebelo. En esta vía, la organización somatotópica de la corteza se distorsiona y forma una representación táctil fracturada en el cerebelo (Leergaard *et al.* 2006). Además, la corteza somatosensorial primaria proyecta al núcleo rojo (Mabuchi y Kusama 1966) y a los núcleos vestibulares (Wilson *et al.* 1999).

4. Sinapsis

Las sinapsis son contactos neuronales especializados en los que tiene lugar la mayor parte de la transmisión de información en el SNC. Se ha estimado que la corteza cerebral humana contiene del orden de 10^{14} sinapsis que conectan 20×10^9 neuronas (Pakkenberg *et al.* 2003). En general, en la corteza, las sinapsis más abundantes se establecen entre un axón y una dendrita, seguidas por las sinapsis axo-somáticas, y las axo-axónicas.

Atendiendo al mecanismo de transmisión de la información las sinapsis se dividen en químicas y eléctricas (Figura 8):

4.1 Sinapsis químicas

Las sinapsis químicas son las más abundantes en el SNC (Grimnes y Martinsen 2015). En estas sinapsis las membranas pre- y postsináptica están separadas unos 20nm por la hendidura sináptica. El paso de la información se produce por la liberación de un neurotransmisor por parte de la neurona presináptica que interactúa con receptores específicos localizados en la membrana de la neurona postsináptica. Se trata de sinapsis unidireccionales, más lentas que las eléctricas, pero mucho más plásticas.

4.1.1 Transmisión sináptica

El potencial de acción es una corriente eléctrica que viaja por el axón hasta los terminales presinápticos. En estos terminales el

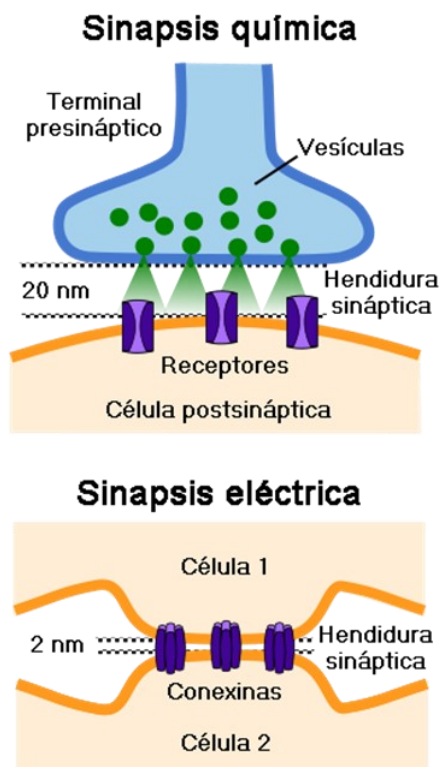


Figura 8. Diagrama de una sinapsis eléctrica y una sinapsis química.

neurotransmisor se acumula en las vesículas sinápticas. Parte de estas vesículas están ancladas a la membrana, en la llamada zona activa. Dichas vesículas liberan su contenido a la hendidura sináptica cuando el potencial de acción induce el aumento de Ca^{2+} intracelular en el terminal. En el lado postsináptico los receptores específicos para dicho neurotransmisor se agrupan en la densidad postsináptica (PSD por sus siglas en inglés, *postsynaptic density*). Hay dos tipos principales de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos.

Los receptores **ionotrópicos** son canales iónicos que se abren al unirse con el ligando, lo que permite el intercambio de iones entre ambos lados de la membrana. Según la naturaleza de estos iones, se produce una despolarización o una hiperpolarización, generando respectivamente un potencial postsináptico

excitador o inhibidor que se transmitirá por la membrana de la neurona postsináptica.

La unión del ligando a receptores **metabotrópicos**, acoplados a proteínas G, activa cascadas de segundos mensajeros que pueden alterar la sensibilidad de los receptores ionotrópicos, modificar las concentraciones internas de moléculas como diacilglicerol, inositol trifosfato (IP_3), AMPc o Ca^{2+} , o modular diversos canales iónicos (Lerma 1997, Niswender y Conn 2010).

4.1.2 Tipos de sinapsis químicas

Las sinapsis químicas son de dos tipos: **excitadoras**, cuando la unión del neurotransmisor al receptor causa un potencial postsináptico excitador (EPSP por sus siglas en inglés, *excitatory postsynaptic potential*); e **inhibidoras** cuando la unión del neurotransmisor genera un potencial postsináptico inhibidor. En la corteza cerebral las sinapsis excitadoras son las más abundantes, suponen aproximadamente el 90% del total y, en general utilizan Glu como neurotransmisor. Las sinapsis inhibidoras son mucho más escasas (10%) y en su mayoría utilizan GABA.

En estudios de microscopía electrónica se pueden diferenciar estos dos tipos de sinapsis: las excitadoras, también llamadas sinapsis asimétricas, poseen un fino engrosamiento de la membrana presináptica y un prominente engrosamiento postsináptico (Figura 9a). Por el contrario, las sinapsis inhibidoras, o simétricas, presentan engrosamientos finos en ambas membranas (Figura 9b) (Colonnier 1968, Gray 1959b, Peters *et al.* 1991).

No obstante, se ha descrito que algunas de las fibras que establecen sinapsis asimétricas o simétricas expresan otros neurotransmisores, como acetilcolina, serotonina, noradrenalina o dopamina (Beaulieu y Somogyi 1990, DeFelipe y

Jones 1988, Descarries y Mechawar 2000), pero la proporción de estas sinapsis es muy pequeña comparada con el total de sinapsis glutamatéricas y GABAérgicas.

4.1.3 Localización de las sinapsis

Los somas de las neuronas piramidales reciben sinapsis de naturaleza inhibitoria, mientras que los somas de las interneuronas reciben ambos tipos de sinapsis. No obstante, la mayoría de las sinapsis (90-98%) se realizan en el neuropilo (Alonso-Nanclares *et al.* 2008, Peters *et al.* 1991). En el neuropilo, entre el 80% y el 95% de las sinapsis son excitadoras, provienen de neuronas corticales con espinas (piramidales y estrelladas) y de fibras extrínsecas, mientras que entre el 5% y el 20% de las sinapsis son inhibitorias y generalmente se originan desde interneuronas locales (Beaulieu y Colonnier 1985, DeFelipe 2011, DeFelipe y Fariñas 1992, Feldman 1984, Silberberg 2008, White 2007, White y Keller 1989).

Las sinapsis en dendritas se pueden establecer sobre las espinas dendríticas o realizarse sobre el tallo dendrítico (Beaulieu y Colonnier 1985, Calverley y Jones 1987, Peters *et al.* 1991). Las sinapsis asimétricas (excitadoras) se encuentran con mayor frecuencia en las espinas, tanto en la cabeza como en el cuello, mientras las sinapsis

simétricas (inhibidoras) se dan generalmente sobre el tallo dendrítico. No obstante, éstas también pueden estar presentes ocasionalmente en el cuello y cabeza de las espinas (Chiu *et al.* 2013, Yuste 2010).

4.1.4 Composición de la densidad postsináptica

Como se ha comentado previamente, la PSD de las sinapsis excitadoras es muy diferente de la de las inhibitorias. Esto se puede observar en microscopía electrónica, que muestra PSDs engrosadas en las sinapsis excitadoras, y PSDs delgadas en el caso de las inhibitorias. Aparte de esta diferencia morfológica, que nos permite distinguirlas al microscopio electrónico, las sinapsis excitadoras e inhibitorias se diferencian por la composición molecular de su PSD:

4.1.4.1 PSD de sinapsis excitadoras

Los principales elementos que componen la PSD de una sinapsis excitadora son:

Receptores de Glu: Se encuentran insertados en la membrana de la PSD. Son de tres tipos: NMDA, AMPA y kainato. Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) se encuentran en la periferia de las sinapsis.

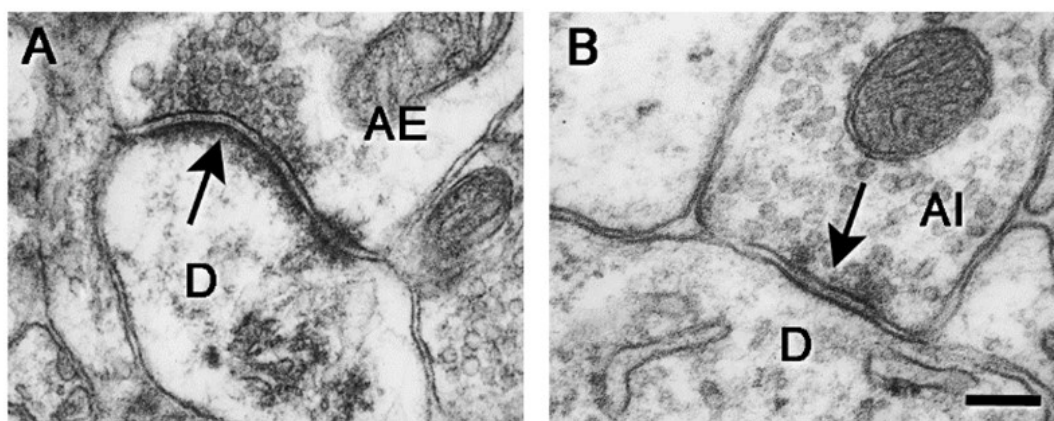


Figura 9. Sinapsis asimétrica y simétrica vistas mediante microscopía electrónica. **(A)** Sinapsis asimétrica, la membrana postsináptica está mucho más engrosada que la presináptica. **(B)** sinapsis simétrica, ambas membranas tienen engrosamientos similares. AE, axón excitador; AI, axón inhibitor; D, dendrita. Las flechas señalan la sinapsis. Modificado de SynapseWeb (Kristen M. Harris, PI, <http://synapseweb.clm.utexas.edu/>).

Los receptores de NMDA (NMDAR) son canales tetraméricos responsables del componente lento de la activación sináptica. Son permeables principalmente al Ca^{2+} y al Na^+ , aunque su permeabilidad iónica depende del tipo de subunidades que los componen, así como de su estado de fosforilación (Bloodgood y Sabatini, 2007, Skeberdis *et al.* 2006).

Los receptores de AMPA (AMPA) son receptores ionotrópicos que pueden ser permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Existen cuatro subunidades (GluA1, GluA2, GluA3 y GluA4) que pueden formar este receptor, otorgándole distintas características. Por ejemplo, cuando tienen la subunidad GluA2 se tornan impermeables al Ca^{2+} . Las neuronas que no expresan GluA2 carecen de espinas y generan potenciales postsinápticos rápidos, mientras que las que tienen altos niveles de dicha subunidad tienen muchas espinas y generan potenciales lentos. Por tanto, las espinas generalmente poseen canales de AMPA en gran medida impermeables a Ca^{2+} y generan potenciales lentos. No obstante, los AMPAR no se encuentran presentes en todas las PSDs, aproximadamente el 15% de ellas carecen de este receptor, por lo que podría tratarse de sinapsis silentes (Nusser *et al.* 1998, Yuste 2010).

Los receptores de kainato son receptores ionotrópicos que comparten numerosos agonistas y antagonistas con los receptores AMPA, por lo que en muchas ocasiones se agrupan con ellos como “receptores no NMDA”. Sin embargo, la selectividad de algunas moléculas como las benzodiazepinas pone de manifiesto la identidad independiente de ambos tipos de receptores (Lerma 2003). Los receptores de kainato están implicados en la integración sináptica, en fenómenos de plasticidad, regulación de la liberación de

neurotransmisores y el control de la excitabilidad neuronal (Pinheiro y Mulle 2006).

Los mGluR se localizan en la periferia de las PSDs (Baude *et al.* 1993, Lujan *et al.* 1996, Mansouri *et al.* 2015). Son específicamente de dos tipos, mGluR1 y mGluR5. Se trata de receptores acoplados a proteínas G, quienes activan fosfolipasa C, responsable de la producción de IP_3 y diacilglicerol. Estos segundos mensajeros provocan la liberación de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplasmático liso (Yuste *et al.* 2000), así como la activación de cascadas de transcripción, con efectos a largo plazo.

Proteínas de adhesión molecular: Median el contacto sináptico por la unión a proteínas localizadas en la presinapsis. Un ejemplo bien descrito es la interacción de neurexinas presinápticas con neuroliginas postsinápticas (Sheng y Kim 2011).

Proteínas de andamiaje: Proteínas como PSD-95, PSD-93 o SAP102 (Sheng y Sala 2001) crean el andamiaje que da forma a la PSD mediante dominios de unión, que les permiten interaccionar con otras proteínas (Yuste 2010). Mediante PSD-95, los NMDAR se unen a varias proteínas como GKAP, Shank y Homer, y mediante el complejo PSD-95/GKAP/Shank/Homer, los NMDAR conectan con mGluR y con IP_3R . Todas estas interacciones permiten a la sinapsis regular la activación de los receptores así como las cascadas de señalización (Tu *et al.* 1999).

Proteínas de señalización: Como kinasas, fosfatasa y GTPasas, que regulan múltiples aspectos de la estructura y función sináptica (Sheng y Kim 2011).

4.1.4.2 PSD de sinapsis inhibitoras

La especialización postsináptica de las sinapsis inhibitoras es mucho menos elaborada que la

de las excitadoras. Al igual que en las sinapsis asimétricas, hay moléculas de adhesión que aseguran el alineamiento de las membranas pre y postsinápticas. En estas sinapsis, los receptores que se insertan en la membrana son principalmente GABAérgicos. Los receptores interaccionan con la proteína de andamiaje gefirina, quien a su vez interacciona con otras proteínas que la anclan a los filamentos de actina (Sheng y Kim 2011).

4.1.5 Tamaño y forma de las sinapsis

Las sinapsis son estructuras dinámicas que pueden sufrir modificaciones debido a variaciones en los patrones de actividad; son remodeladas y reemplazadas continuamente como parte del funcionamiento normal del cerebro (Fauth y Tetzlaff 2016, Lisman 2017). Esto implica que su tamaño cambia como reflejo de la eficacia de la sinapsis. El área de la zona activa es proporcional al número de vesículas ancladas y a la probabilidad de la liberación de neurotransmisor (Branco *et al.* 2010, Holderith *et al.* 2012, Matz *et al.* 2010, Schikorski y Stevens 1997). En el lado postsináptico, el área de la PSD es proporcional al número de receptores postsinápticos (Ganeshina *et al.* 2004a, Ganeshina *et al.* 2004b, Kharazia y Weinberg 1999, Nusser *et al.* 1998, Takumi *et al.* 1999, Tarusawa *et al.* 2009). Por lo tanto, los cambios en las áreas de la zona activa y la PSD conllevan consecuencias funcionales.

Las sinapsis presentan gran variación en su morfología, generalmente se clasifican en cuatro grupos: maculares, cuando tienen forma de disco; en herradura, cuando presentan una o varias hendiduras; perforadas, cuando tienen forma de anillo; y fragmentadas, cuando la PSD está dividida en varias partes independientes (Figura 10). Actualmente se desconocen las implicaciones funcionales de estos diferentes tipos morfológicos (Calverley y Jones 1990,

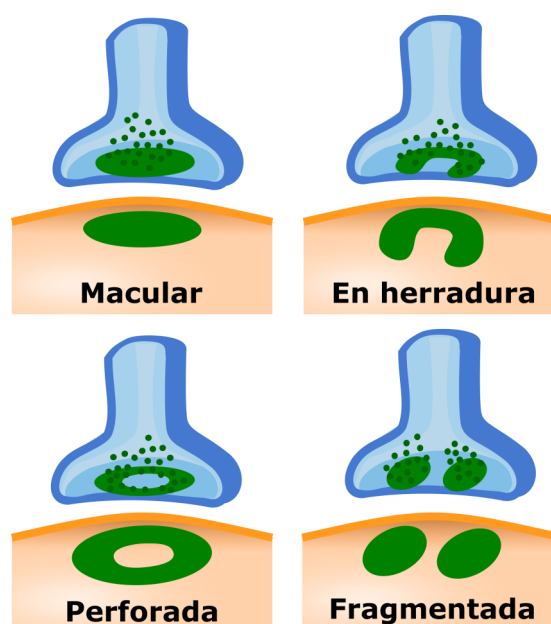


Figura 10. Las sinapsis pueden ser maculares, cuando tienen forma de disco; en herradura, cuando presentan hendiduras; perforadas, cuando tienen forma de anillo; y fragmentadas, cuando la PSD está dividida en partes independientes.

Carlin y Siekevitz 1983, Geinisman *et al.* 1993, Geinisman *et al.* 1987, Sorra *et al.* 1998, Toni *et al.* 2001).

4.2 Sinapsis eléctricas

Las sinapsis eléctricas se distinguen de las sinapsis químicas por diversas características morfológicas y fisiológicas. La diferencia más relevante es que en las sinapsis eléctricas los elementos pre y postsináptico están separados por una hendidura de 2 nm de ancho, pero a lo largo del contacto sináptico existen uniones estrechas que conectan el interior de las células adyacentes, mientras que en las sinapsis químicas, los elementos pre y postsináptico están separados por una hendidura sináptica de 10-20 nm de ancho y no existen uniones estrechas. Estas uniones estrechas están formadas por conexinas, que permiten el paso de iones de un citoplasma a otro. Son sinapsis

que permiten el paso uni o bidireccional de corrientes eléctricas muy rápidas y de pequeñas moléculas orgánicas. No obstante, son poco plásticas. En el cerebro de los mamíferos se encuentran ampliamente distribuidas, hecho que ha pasado desapercibido durante mucho tiempo debido a la dificultad para estudiar estas conexiones. No obstante, en la neocorteza las sinapsis eléctricas entre neuronas excitadoras son raras, y son algo más frecuentes entre interneuronas inhibitorias, principalmente entre interneuronas que expresan parvalbúmina (Connors y Long 2004).

5. Las espinas dendríticas

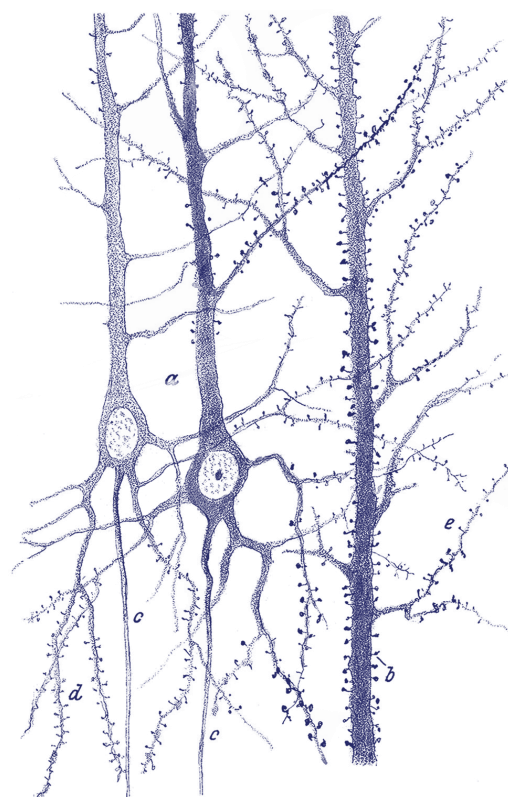
5.1 Aspectos generales

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias presentes en las dendritas de muchas neuronas. Fueron descritas por primera vez en 1888 por Cajal (Figura 11) (DeFelipe 2015b). Aunque son bastante heterogéneas tanto en forma como en tamaño, típicamente poseen una cabeza de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ de diámetro unida al tallo de la dendrita mediante un cuello de en torno a $0,2\ \mu\text{m}$ de diámetro y longitud variable (Yuste 2010). Están especializadas en la recepción de información, formando el principal elemento postsináptico de las sinapsis excitadoras corticales (Gray 1959a), de manera que este tipo de sinapsis se da mayoritariamente sobre las espinas y rara vez sobre el tallo dendrítico (Colonnier 1968). De hecho, en el cerebro adulto se estima que la gran mayoría de las espinas dendríticas establecen contactos sinápticos, lo que apoya la asunción de “una espina=una sinapsis”. No obstante se ha descrito que alrededor de un 4% de espinas carecen de sinapsis—consideradas espinas en formación o en proceso de eliminación (Arellano *et al.* 2007b)—, mientras que otras pueden establecer varias sinapsis

(Feldman 1984, Harris *et al.* 1992, Harris y Kater 1994, Jones y Powell 1969, Popov *et al.* 2005).

La presencia de espinas es variable entre los distintos tipos neuronales. Por ejemplo, son muy abundantes en las células de Purkinje del cerebelo, así como en las neuronas piramidales de la corteza cerebral (neocorteza e hipocampo). Por el contrario están ausentes o son muy escasas en las interneuronas inhibitorias (Yuste 2010). Además de en la corteza cerebral y el cerebelo, las neuronas con espinas se encuentran en otras estructuras como el estriado (llamadas neuronas espinosas medianas) (Somogyi y Smith 1979), o el tálamo (Paxinos 2004).

La distribución y el tamaño de las espinas varía



a lo largo de la dendrita y hay diferencias entre

Figura 11. Dibujo de Santiago Ramón y Cajal para demostrar la existencia de espinas dendríticas en neuronas piramidales de corteza cerebral utilizando el método del azul de metileno (DeFelipe 2015b).

dendritas apicales y basales (Anton-Sanchez *et al.* 2017, Benavides-Piccione *et al.* 2013). La distribución radial de las espinas a lo largo de la dendrita sigue un patrón aleatorio, y no helicoidal como sugerían los primeros trabajos en este campo (Morales *et al.* 2014).

Inicialmente se propuso que la función de las espinas podría ser la de aumentar la superficie de la dendrita y facilitar el contacto sináptico con los axones de las inmediaciones (Peters y Kaiserman-Abramof 1970), pero los últimos descubrimientos apuntan a un papel mucho más funcional que meramente estructural. En esta visión, las espinas actúan como compartimentos bioquímicos independientes dada su capacidad para aislar los cambios en la composición química de su citoplasma.

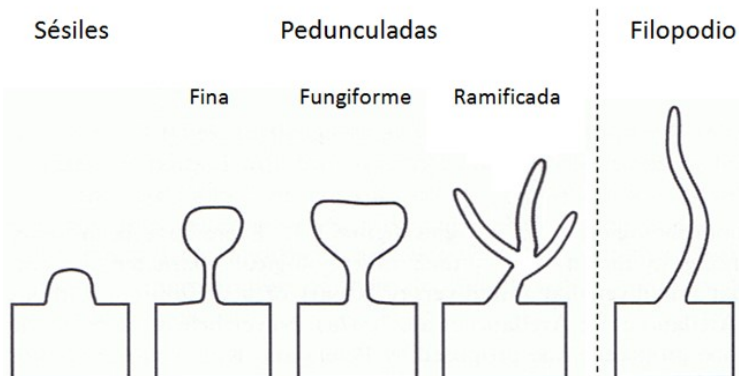
5.2 Morfología de las espinas dendríticas

Como ya se ha mencionado, las espinas dendríticas presentan gran variedad de morfologías por lo que clasificarlas en grupos discretos es muy complejo. La clasificación más extendida las divide en sésiles y pedunculadas, las pedunculadas a su vez se dividen en finas, fungiformes y ramificadas (Jones y Powell 1969, Peters y Kaiserman-Abramof 1970). Las espinas sésiles carecen de cuello y son más abundantes durante el desarrollo posnatal temprano; las finas son las más comunes, tienen un cuello

delgado y largo con una cabeza pequeña; las fungiformes tienen igualmente un cuello delgado y la cabeza más grande; y las ramificadas son las más alargadas y carecen de cabeza (Peters y Kaiserman-Abramof 1970). Los filopodios son apéndices que surgen del tallo dendrítico y carecen de cabeza bulbosa (Figura 12). Esta clasificación ha sido utilizada durante muchos años y actualmente un gran número de estudios siguen haciendo uso de ella; no obstante, la gran variedad de espinas con formas intermedias pone de manifiesto la arbitrariedad de dicha clasificación, puesto que la morfología de las espinas en realidad forma un continuo difícilmente divisible (Arellano *et al.* 2007a, Konur *et al.* 2003). De hecho, se ha descrito que el volumen y la longitud de las espinas siguen una distribución unimodal (Arellano *et al.* 2007a, Benavides-Piccione *et al.* 2013).

Esta variabilidad estructural está directamente relacionada con la funcionalidad de las espinas, puesto que se ha descrito una clara correlación entre el volumen de la espina y el tamaño de la PSD. Además, se ha descrito una correlación entre los parámetros morfológicos y funcionales de las espinas. Concretamente, el volumen de la cabeza se correlaciona con el área de la PSD, el número de receptores postsinápticos y la cantidad de neurotransmisor listo para ser liberado (Arellano *et al.* 2007a), mientras que la longitud del cuello es

Figura 12. Clasificación tradicional de la morfología de las espinas dendríticas. Pese a que esta clasificación es muy utilizada, el continuo que presenta la morfología de las espinas sugiere que dichas divisiones son arbitrarias. Modificado de Yuste (2010).



proporcional al grado de aislamiento bioquímico y eléctrico de la espina respecto a la dendrita (Araya *et al.* 2006). Además, se ha demostrado que las espinas más grandes pueden generar corrientes sinápticas mayores que las espinas pequeñas (Vlachos *et al.* 2009). Por último, las espinas dendríticas son estructuras dinámicas cuya forma fluctúa, y esta propiedad parece tener implicaciones importantes en los procesos cognitivos y de memoria (Kasai *et al.* 2010b, Matsuzaki *et al.* 2004).

5.3 Estructura de las espinas dendríticas

Además de la PSD, descrita anteriormente (véase el Epígrafe 4.1.4 Composición de la densidad postsináptica), las espinas dendríticas presentan otros elementos:

El citoplasma de las espinas está ocupado por filamentos de actina que forman una red muy plástica. Por un extremo los microfilamentos interaccionan con la membrana y la PSD y por el otro forman un ovillo a la altura del cuello de la espina (Fifková y Delay 1982). El citoplasma contiene polirribosomas por lo que se las ha asociado con la síntesis proteica local de, por ejemplo, moléculas implicadas en la sinapsis como CaMKII α , FRMP o Arc (Yuste 2010).

Las espinas con cabezas de mayor volumen generalmente contienen retículo endoplásmico liso, que se continúa desde el tallo de la dendrita. Participa principalmente en la regulación de los niveles de Ca²⁺ y posiblemente en el tráfico intracelular de moléculas dentro de las espinas. El retículo endoplásmico liso se puede encontrar formando vesículas, túbulos o el aparato de espina. En el hipocampo, se ha estimado que aproximadamente el 80% de las espinas tienen un aparato de espina (Holbro *et*

al. 2009). Este aparato de espina consiste en una asociación de cisternas de retículo endoplásmico liso y placas proteicas electrodensas (Gray 1959b). En la Figura 13 se muestran los principales elementos presentes en una espina dendrítica, diferenciando entre una espina con aparato de espina y una espina que carece de esta estructura.

5.4 Función de las espinas dendríticas

Como se ha mencionado anteriormente, la función de las espinas no parece ser simplemente la de proporcionar una estructura para establecer una sinapsis. Se ha propuesto la teoría de que las espinas actúan como compartimentos aislados de Ca²⁺, con capacidad para regular su concentración de forma independiente al resto del citoplasma (Bloodgood y Sabatini 2007). En la Figura 14 se representan los elementos implicados en la dinámica de Ca²⁺ dentro de la espina. No obstante, estudios realizados en dendritas que carecen de espinas sugieren que no es necesaria la presencia de estas estructuras para generar compartimentos de Ca²⁺ independientes. Para que se formen estos compartimentos es suficiente únicamente con la presencia de canales de AMPA y una forma rápida de retirar Ca²⁺ del citoplasma (mediante intercambiadores Na⁺/Ca²⁺) (Yuste 2010). Por tanto, parece plausible que la función de las espinas no se limite solo a compartimentar Ca²⁺. De hecho, estudios recientes demuestran que el Ca²⁺ no es la única molécula cuyo paso a través del cuello se ve limitado. También se ha observado este fenómeno con el Na⁺, IP₃, cAMP, GTPasas, mRNA (Hugel *et al.* 2009, Yuste 2010). El cuello de la espina también actúa de filtro eléctrico, puesto que la longitud del cuello de la espina es inversamente proporcional a los

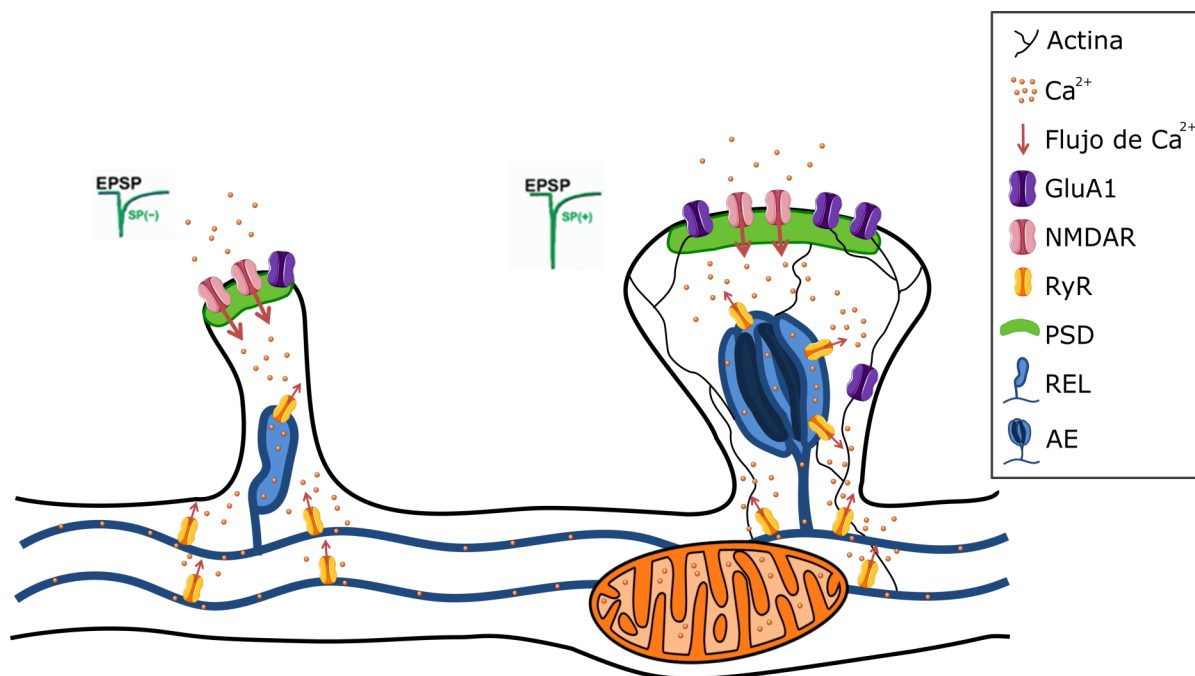


Figura 13. Principales elementos presentes en una espinilla dendrítica, diferenciando entre una espinilla con aparato de espinilla y otra que carece de él. AE, aparato de espinilla; EPSP, potencial postsináptico excitador; GluA1, receptor de AMPA tipo 1; NMDAR, receptor de NMDA; PSD, densidad postsináptica; REL, retículo endoplasmático liso; RyR, Receptor de rianodina. Modificado de Vlachos et al (2009).

potenciales registrados en el soma tras la estimulación de la espinilla dendrítica (Araya *et al.* 2006, Yuste 2010, Yuste 2013).

5.5 Plasticidad

5.5.1 Modulación sensorial

Las señales sensoriales tienen gran importancia en el desarrollo de las espinas y el establecimiento de las sinapsis. Si bien durante las primeras etapas del desarrollo las espinas presentan gran plasticidad, tras la disminución en el número de espinas sufrida durante la reorganización cortical asociada a la entrada de información sensorial, la plasticidad de las restantes disminuye notablemente hasta alcanzar el periodo de madurez en el que las espinas son más estables. No obstante, esta estabilidad no implica que desaparezca la capacidad para establecer nuevas sinapsis o generar espinas *de novo* (Knott y Holtmaat

2008). Además, una vez las sinapsis han sido establecidas, las entradas sensoriales influyen sobre la morfología de las espinas (Katz y Shatz 1996, Miller y Peters 1981). Por otra parte, el estudio de especies precociales como la cobaya (completamente desarrolladas en el momento del nacimiento) ha demostrado que éstas experimentan la mayor parte de la espinogénesis y sinaptogénesis de las cortezas sensoriales antes del nacimiento, de forma independiente de la actividad sensorial (Schuz 1981).

5.5.2 Potenciación postsináptica

Los cambios que se producen en la actividad neuronal inducen cambios en las espinas dendríticas. Uno de los aspectos más estudiados es la relación entre la memoria y las espinas. La LTP es un modelo clásico de aprendizaje: la estimulación tetánica breve de una neurona induce cambios morfológicos en la

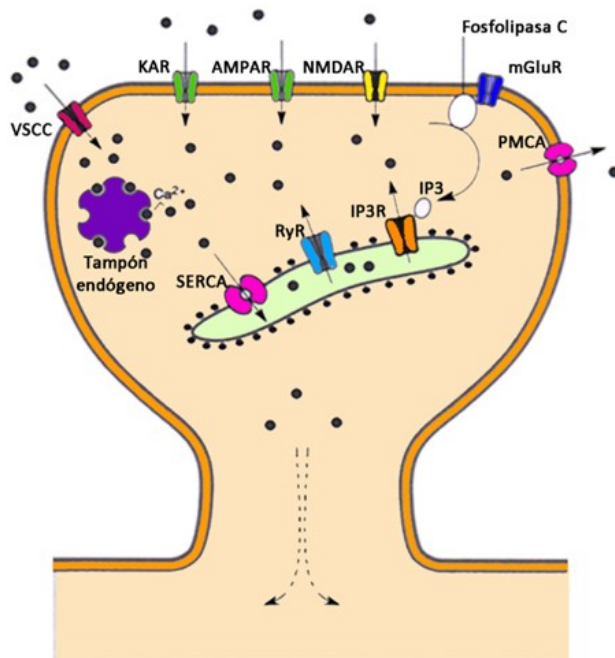


Figura 14. Dinámica del Ca^{2+} en una espin dendrítica. Los círculos negros representan los iones de Ca^{2+} . Las líneas punteadas reflejan un flujo de Ca^{2+} limitado. VSCC, canal de calcio activado por voltaje; KAR, receptor de kainato; AMPAR, receptor de AMPA; NMDA, receptor de NMDA; mGluR receptor metabotrópico de glutamato; PMCA, ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática; SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplasmático; RyR, receptor de rianodina; IP₃, inositol trifosfato; IP₃R, receptor de IP₃. Modificado de Yuste (2010).

sinapsis lo que conlleva su potenciación. Los cambios que produce la LTP sobre las espinas pueden ser de dos tipos: morfológicos y de densidad. La controversia en torno a estos cambios es notable, y numerosos artículos encuentran resultados altamente contradictorios. Algunos estudios ponen de manifiesto que la estimulación tetánica incrementa el tamaño de la cabeza de la espin, además aumenta la anchura del cuello y disminuye su longitud. Sin embargo, otros estudios afirman que no hay cambios morfológicos sino un incremento en el número de espinas y sinapsis, y otros aseguran que no hay cambios en ninguno de los parámetros mencionados (revisado en Yuste 2010).

6. Las mitocondrias

El cerebro tiene un consumo metabólico muy elevado, en gran parte debido a la actividad sináptica. Esta energía proviene principalmente de la fosforilación oxidativa, producida en las mitocondrias. Las mitocondrias son orgánulos característicos de los organismos eucariotas encargados de suministrar energía a las células. Poseen una membrana externa lisa y una

membrana interna altamente invaginada (Figura 15). Las invaginaciones de la membrana interna forman las crestas mitocondriales, ricas en proteínas que forman la cadena de transporte de electrones, y en ATP sintasa, ambas responsables del almacenamiento de energía en forma de ATP. En la matriz mitocondrial se encuentra el ADN mitocondrial, de carácter circular, vestigio de su origen bacteriano. Este ADN codifica únicamente un pequeño número de proteínas, siendo fundamental la síntesis a nivel nuclear del resto de las proteínas mitocondriales para el correcto funcionamiento de la mitocondria.

Las mitocondrias son vitales para el mantenimiento del sistema nervioso, ya que además de la producción de energía cumplen gran cantidad de funciones durante el ciclo vital de la célula, participando en señalización celular, diferenciación celular, ciclo celular, crecimiento, envejecimiento y muerte celular (Tao *et al.* 2014). Además, están implicadas en el flujo de Ca^{2+} durante la transmisión sináptica (Pozzan *et al.* 2000).

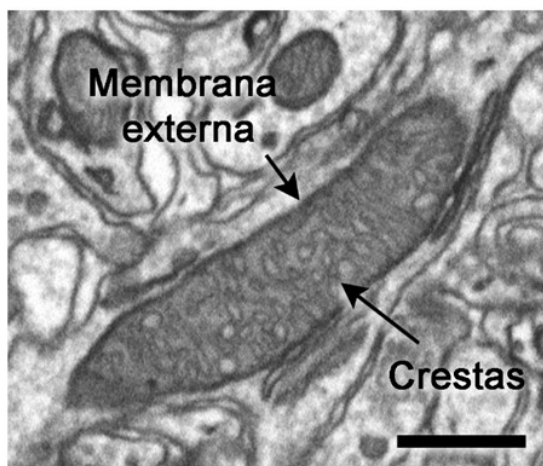


Figura 15. Imagen de una mitocondria obtenida mediante microscopía electrónica. Se puede observar una membrana externa que rodea todo el orgánulo y una membrana interna que presenta gran cantidad de invaginaciones en forma de crestas.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que sufren constantemente procesos de fusión y fisión (Chen y Chan 2005). Son transportadas a lo largo de axones y dendritas mediante las proteínas motoras kinesinas y dineínas hacia zonas que requieren aporte energético (Chang *et al.* 2006, Obashi y Okabe 2013, Takihara *et al.* 2015). En las neuronas la energía se emplea principalmente en la transmisión sináptica (Harris *et al.* 2012). De hecho, se ha observado que las mitocondrias están asociadas a las sinapsis, e incluso pueden estar ancladas a zonas de liberación vesicular (Rowland *et al.* 2000), donde proporcionan ATP y actúan como tampones de Ca^{2+} (Li *et al.* 2004). En general, la mayor parte del gasto energético se produce en el elemento postsináptico para revertir los movimientos iónicos que se producen durante la respuesta sináptica. En las sinapsis excitadoras el gasto energético es mayor que en las sinapsis inhibitoras puesto que en estas últimas el potencial de repolarización está más próximo al potencial de reposo (Harris *et al.* 2012).

Por último, la disfunción mitocondrial es causa de gran número de patologías del sistema nervioso. Las mutaciones en el ADN mitocondrial se describieron por primera vez en la miopatía mitocondrial y en la atrofia óptica hereditaria de Leber, ambas enfermedades metabólicas raras (Holt *et al.* 1988, Porrero *et al.* 2010, Wallace *et al.* 1988). En la actualidad se sabe que la disfunción mitocondrial está implicada en patologías como la diabetes, el cáncer y algunas de las enfermedades neurodegenerativas más importantes, como el Parkinson, el Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica o la Corea de Huntington (Beal 2005, Wallace 1999). Por estos motivos, el interés por el estudio de las mitocondrias se ha incrementado notablemente durante los últimos años.

Dada la relación descrita entre la actividad sináptica y el consumo energético, en el presente estudio describimos la relación cuantitativa entre el número de sinapsis y el volumen de mitocondrias.

7. Aspectos comparativos del cerebro del humano y del roedor

La evolución del cerebro de los mamíferos se caracteriza por una gran expansión del encéfalo, así como por el desarrollo muy notable de la neocorteza. La evolución cortical podría deberse únicamente a un incremento en el número de unidades funcionales, de manera que la complejidad aumentaría al añadir microcircuitos con la misma estructura básica, o, además de aumentos cuantitativos, podría haber también cambios cualitativos que supusiesen especializaciones únicas del cerebro humano (DeFelipe *et al.* 2007, Molnar y Clowry 2012). En concreto, el cerebro de los roedores se caracteriza por tener un tamaño, en relación

al tamaño corporal, muy inferior al de los humanos y por ser lisencéfalo, es decir, la corteza carece de circunvoluciones. Ambas características implican un menor número de unidades columnares, pero no una menor densidad neuronal. De hecho, la corteza cerebral de la rata presenta mayor densidad de neuronas y de sinapsis que el cerebro humano (DeFelipe *et al.* 2002). Por otra parte, la corteza cerebral humana presenta un incremento del 10% en la proporción de interneuronas inhibitoras frente a la corteza de la rata. Por ejemplo, la corteza de la rata carece de interneuronas *double bouquet* o éstas son muy poco abundantes. Sin embargo, en el cerebro de primates (incluyendo el cerebro humano), las células *double bouquet* son tan numerosas que forman una estructura microcolumnar muy densa. Parece plausible asumir que el incremento de neuronas inhibitoras en la corteza humana responda a la aparición de éste nuevo tipo neuronal, entre otras interneuronas, como las que expresan tirosina-hidroxilasa (Benavides-Piccione y DeFelipe 2003). De hecho, se ha descrito que en el cerebro humano hay dos linajes de interneuronas GABAérgicas: el primero expresa *Dlx1/2* y *Mash1*, supone el 65% de las neuronas GABAérgicas, se originan en las zonas ventricular y subventricular del telencéfalo dorsal y migran radialmente hasta la corteza cerebral; el segundo linaje no expresa *Mash1*, representa el 35% de las neuronas GABAérgicas y se originan en la eminencia ganglionar, desde donde migran tangencialmente a la corteza. En el caso de los roedores, prácticamente todas las neuronas GABAérgicas se originan en la eminencia ganglionar y migran tangencialmente a la corteza (revisado en DeFelipe *et al.* 2007). Es decir, la corteza humana tiene menor densidad neuronal pero mayor proporción de neuronas inhibitoras, además de tipos de interneuronas inexistentes en el cerebro del roedor.

También se han encontrado diferencias en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales, siendo mucho más abundantes en las dendritas humanas frente a las de roedor. Puesto que las espinas son las principales dianas de las sinapsis excitadoras, se deduce que las neuronas piramidales humanas reciben más conexiones excitadoras que las de roedor. Las espinas dendríticas humanas son además más voluminosas y tienen cuellos más largos. Todo esto conlleva un procesamiento diferente de la información (DeFelipe 2011).

Pese a que en humanos hay mayor densidad de espinas por dendrita, la densidad de neuronas es menor, por lo que la densidad sináptica es también menor. Sin embargo, las proporciones de sinapsis asimétricas y simétricas se mantienen aproximadamente constantes entre especies (DeFelipe *et al.* 2002). Para que esto sea así, y dado que en humanos hay mayor proporción de interneuronas inhibitoras, éstas han de hacer menor número de contactos sinápticos que las neuronas piramidales. La variación entre especies de la distribución, número, morfología y características neuroquímicas tanto de las neuronas piramidales como de las interneuronas apoyan la teoría de que hay una evolución de los circuitos corticales y no solo un incremento de sus unidades funcionales (DeFelipe 2011, DeFelipe *et al.* 2007, DeFelipe *et al.* 2002).

Una de las características más notorias de la neocorteza del roedor es la presencia de la corteza de barriles. Se trata de una especialización de la capa IV de la corteza somatosensorial primaria, en la que las neuronas se agrupan en barriles, que representan los campos receptivos de las vibras. Los agrupamientos neuronales son frecuentes en otras especies, aunque han sido mucho menos estudiados (DeFelipe 2011).

Pese a las marcadas diferencias entre los cerebros de los vertebrados, los estudios comparativos han puesto de manifiesto la existencia de un patrón común de organización. La existencia de regiones homólogas, determinadas por su origen neural, localización y funcionalidad (Paxinos 2004), permite extrapolar (no sin cierta cautela) los conocimientos adquiridos en distintas especies. En concreto, la correspondencia entre funcionalidad y citoarquitectura de las cortezas motoras y sensoriales se mantiene más o menos constante entre especies (Schubert *et al.* 2007). Sin embargo, es mucho más difícil establecer correlaciones entre las áreas asociativas puesto que éstas se desarrollan a lo largo de la evolución para adaptarse a funciones muy distintas dependiendo de la especie.

8. El desarrollo cortical

El presente estudio se ha realizado en ratas de catorce días de edad postnatal (P14) para poder integrar nuestros datos con la gran cantidad de datos estructurales y electrofisiológicos que se están obteniendo en el proyecto europeo Blue Brain usando animales de esta misma edad (Markram *et al.* 2015).

8.1 El desarrollo prenatal

El desarrollo del cerebro de la rata comienza con la formación del tubo neural a los 11 días de gestación y acaba en la edad adulta. Las capas corticales se desarrollan a partir de las vesículas telencefálicas: las neuronas piramidales se originan en la zona subventricular y migran radialmente hacia la corteza para formar la placa cortical, mientras que las interneuronas se dividen en las eminencias ganglionares y migran lateralmente

hacia la corteza. Sea cual sea su origen, las neuronas se asientan en la corteza de dentro hacia fuera, es decir, las últimas neuronas generadas se localizan en las capas más externas (Kandel *et al.* 2000, Molnar y Clowry 2012).

8.2 Sinaptogénesis postnatal

La sinaptogénesis postnatal en la corteza somatosensorial ha sido estudiada por DeFelipe *et al.* (1997), quienes describieron que, en el ratón, el número de sinapsis aumenta dramáticamente de P4 a P32 y disminuye ligeramente en el adulto. La proporción entre sinapsis asimétricas y simétricas, al igual que su densidad, varía con el desarrollo: entre P4 y P8 ambas presentan proporciones similares, en P11 el porcentaje de sinapsis asimétricas se incrementa mientras que el de simétricas disminuye hasta alcanzar la diferencia máxima en P32, cuando el 90% de las sinapsis son asimétricas y sólo un 10% son simétricas. Finalmente, en el cerebro adulto las sinapsis asimétricas representan el 85% y las simétricas el 15%.

La disminución de sinapsis, especialmente excitadoras, en las últimas etapas del desarrollo corresponde al proceso de eliminación sináptica: durante el desarrollo se establecen muchas más sinapsis de las que son necesarias para el funcionamiento cerebral, de tal manera que se eliminan todas aquellas sinapsis que no son necesarias. De esta forma, aumentaría la eficiencia de la red neural (Santos y Noggle 2011).

En el caso de la corteza somatosensorial de la rata, estudiada por Micheva y Beaulieu (1996), el incremento de la densidad sináptica ocurre entre las edades P10 y P15, alcanzando el valor máximo en P20. Los autores no encontraron disminución de la densidad sináptica al final del desarrollo, sugiriendo la ausencia de

mecanismos de eliminación. No obstante, la existencia de mecanismos de eliminación sináptica en la corteza somatosensorial de ratón (DeFelipe *et al.* 1997), en la corteza prefrontal de la rata, así como en otras cortezas de mamíferos (Selemon 2013), sugiere que ésta exista también en la corteza somatosensorial de la rata a pesar de que esto no haya sido detectado en el estudio de Micheva y Beaulieu. Por último, la descripción de estos autores sobre las proporciones entre sinapsis asimétricas y simétricas es similar a la descrita en el ratón, en P5 el 20% de las sinapsis son inhibitorias, en P10 disminuye hasta el 15% y alcanza el mínimo en P20, con un 11%. En la edad adulta se incrementa ligeramente hasta el 14%.

8.3 Espinogénesis

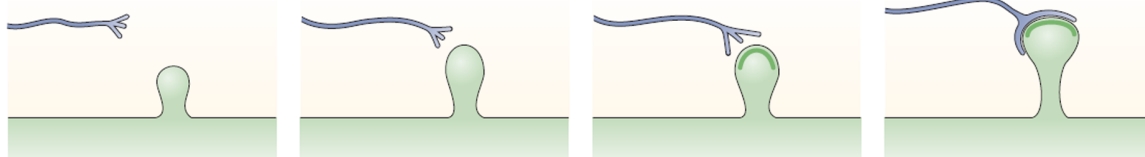
La sinaptogénesis está íntimamente ligada a la formación de espinas dendríticas. Actualmente

se han descrito tres modelos de espinogénesis, se trata de mecanismos no excluyentes que pueden coexistir incluso en la misma célula (Figura 16):

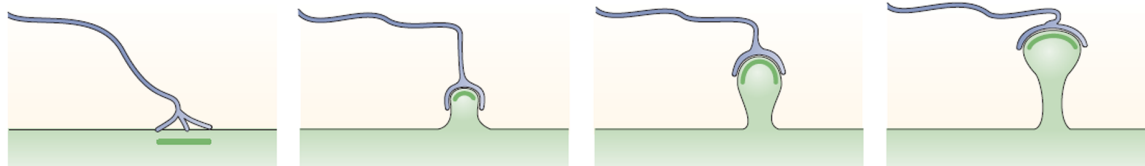
Modelo de Sotelo: En las células de Purkinje la invasión axónica no es necesaria para que se formen espinas con PSDs normales, es decir, la propia célula de Purkinje tiene la información necesaria para formar las espinas, independientemente de la presencia de terminales presinápticos en las inmediaciones (García-López *et al.* 2010).

Modelo de Miller/Peters: En el caso de las neuronas piramidales de la rata, la formación de espinas se da en torno a la primera semana postnatal, mientras que el desarrollo de los axones es anterior, de modo que cuando las espinas se forman, ya hay axones en las inmediaciones con los que hacer sinapsis. Según este modelo la formación de las espinas

a Modelo de Sotelo



b Modelo de Miller/Peters



c Modelo Filopodial

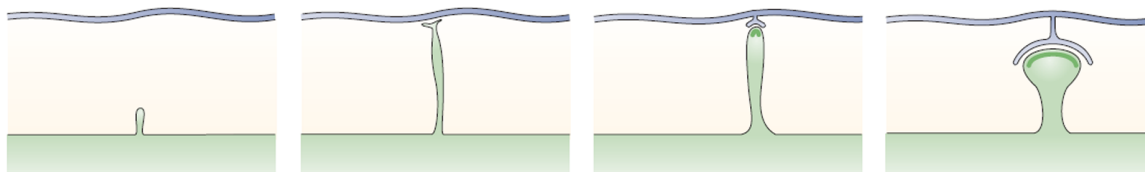


Figura 16. Esquema que muestra las características esenciales de los tres modelos descritos de espinogénesis. En el modelo de Sotelo (a), las espinas emergen independientemente del terminal axónico. En el modelo de Miller/Peters (b) el terminal axónico induce la formación de la espina. Por último, en) el modelo filopodial (c), el filopodio dendrítico captura un terminal axónico y se transforma en espina. Modificado de Yuste y Bonhoeffer (2004).

está asociada a la formación de las sinapsis: en un primer paso las sinapsis se dan sobre el tallo dendrítico, y a raíz de esta interacción se forma una espina que englobaría a la PSD (Yuste y Bonhoeffer 2004).

Modelo filopodial: Los filopodios son apéndices que surgen del tallo dendrítico y carecen de cabeza bulbosa. Son mucho más dinámicos que las espinas y su presencia durante el desarrollo temprano ha hecho que se postulen como precursores de las espinas dendríticas. Este

modelo propone que los filopodios se diferenciarían en espinas tras establecer sinapsis con los axones (García-López *et al.* 2010). Sin embargo algunos estudios demuestran que hay numerosas sinapsis en el tallo dendrítico y la base de los filopodios por lo que se ha propuesto que el filopodio reclutaría la sinapsis, se retraería e incorporaría la sinapsis al tallo dendrítico, después de lo cual surgiría la espina en el lugar en el que se encuentra la sinapsis (Fiala *et al.* 1998).

II. OBJETIVOS

La diversidad funcional presente en los circuitos corticales ha de tener un correlato morfológico, que es el sustrato del flujo de información entre las diferentes capas de la corteza y entre la corteza y otras regiones. Por lo tanto, es necesario caracterizar la organización de los circuitos a nivel sináptico cuantificando el número y la distribución de las sinapsis, y determinando sus características geométricas. Por otra parte, la actividad sináptica, como principal responsable del consumo energético cortical, podría relacionarse con la presencia de mitocondrias, principales productoras de energía. Por ello, resulta de interés establecer la posible relación cuantitativa entre la densidad sináptica y el volumen de tejido ocupado por las mitocondrias.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es describir la microestructura del neuropilo de la corteza somatosensorial primaria de la rata joven, especialmente en relación con el análisis de las sinapsis y mitocondrias. Los objetivos específicos son:

1. Estudiar la distribución de sinapsis en el neuropilo:
 - a. Describir y cuantificar la proporción y densidad de las sinapsis excitadoras e inhibitoras en el neuropilo y buscar posibles diferencias entre las capas corticales.
 - b. Describir y cuantificar la localización de las sinapsis excitadoras e inhibitoras en espinas dendríticas y tallos dendríticos del neuropilo y buscar posibles diferencias entre las capas corticales.
 - c. Analizar la frecuencia de espinas con múltiples sinapsis y la naturaleza de dichas sinapsis.
2. Estudiar el tamaño y la forma de las sinapsis en el neuropilo:
 - a. Determinar la distribución de tamaños de las sinapsis según su naturaleza excitadora o inhibitora, así como en función de su localización en espinas y tallos dendríticos. Analizar posibles diferencias entre las capas corticales.
 - b. Describir la forma y la curvatura de las sinapsis, buscar posibles diferencias en función de su naturaleza excitadora o inhibitora, así como de su localización en espinas y tallos dendríticos. Analizar posibles diferencias entre las capas corticales.
3. Estudiar la distribución de mitocondrias en el neuropilo:
 - a. Describir la fracción de volumen de neuropilo ocupada por mitocondrias y buscar posibles diferencias entre las capas corticales.
 - b. Describir la distribución de mitocondrias en los compartimentos subcelulares y buscar posibles diferencias entre las capas corticales.
 - c. Analizar la posible relación de la fracción de volumen mitocondrial con la densidad de sinapsis.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación del tejido

El presente estudio se ha realizado en ratas de catorce días de edad postnatal para poder integrar nuestros datos con la gran cantidad de datos estructurales y electrofisiológicos que se están obteniendo en el proyecto europeo Blue Brain usando animales de esta misma edad. El citado proyecto pretende no sólo aumentar el conocimiento de la corteza cerebral, sino también obtener información cuantitativa suficiente como para reproducir su funcionamiento a través de modelos a gran escala (Markram *et al.* 2015).

Para este estudio se utilizaron tres ratas Wistar macho de catorce días de edad postnatal. Los animales se sacrificaron catorce días después de su nacimiento mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg) y la perfusión intracardiaca de paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1M, a temperatura ambiente. Los cerebros se extrajeron del cráneo y se postfijaron a 4°C durante una noche en el mismo fijador. Posteriormente se lavaron en tampón fosfato (PB por sus siglas en inglés, *Phosphate buffer*) y cortaron en un vibratomo (Vibratome 1000 plus, PELCO, USA), con un grosor de 150µm. Se seleccionaron las secciones que contenían la corteza somatosensorial primaria que representa la pata trasera del animal, de acuerdo a Paxinos y Watson (2007). Estas secciones fueron osmificadas a temperatura ambiente durante una hora en PB con OsO₄ al 1%, glucosa al 7% y CaCl₂ 0,02M. Tras lavar en PB, las secciones se tiñeron en bloque a 37°C durante 30min con acetato de uranilo al 1% en etanol al 50%, posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en acetona y se incluyeron en Araldita (DeFelipe y Fairen 1993).

Una vez incluidas, las secciones se pegaron con cianocrilato sobre un bloque de Aradita y se tallaron para delimitar el área de interés (Figura 17). Para la correcta localización de la región que se iba a analizar al microscopio electrónico, se obtuvieron cortes semifinos (de 1-2µm de grosor) de la superficie del bloque con un ultramicrotomo (EM UC6, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Dichas secciones se tiñeron con azul de toluidina y se estudiaron con un microscopio óptico. El último de estos cortes semifinos coincide en la práctica con la superficie del bloque que más tarde se estudiará con el microscopio electrónico, por lo que se utilizó para determinar con exactitud las regiones de interés.

Los bloques que contenían el tejido que se deseaba estudiar al microscopio electrónico se pegaron en portamuestras metálicos. Para asegurar la disipación de la carga bajo el haz de electrones, la Araldita se cubrió con una capa de pintura conductora de plata, con cuidado de dejar expuesta la superficie del tejido. Una vez seca la pintura, los bloques se recubrieron con una fina capa de oro/paladio durante 30 segundos (SC7620 Mini Sputter coater. Quorum Technologies, Reino Unido). Para asegurar la exactitud de la localización de las zonas de las que se obtendrían las imágenes de microscopía electrónica se tomó primero una microfotografía panorámica de la superficie del bloque usando el detector de electrones secundarios. Esta imagen se cotejó con la correspondiente al último semifino obtenido del bloque, como se ha comentado previamente.

De manera similar a lo que ocurre en todos los procesamientos para microscopía electrónica, el procedimiento usado aquí provoca una retracción del tejido (Merchan-Perez *et al.* 2009). Para compensar esta retracción en

nuestros cálculos de volúmenes, superficies y longitudes, se midieron las áreas de las secciones de vibratomo antes y después de incluirlas en Araldita, con la ayuda del programa de análisis de imagen FIJI (Schindelin *et al.* 2012). Los factores de corrección obtenidos para medidas de volumen, de superficie y lineales fueron 0,73, 0,81 y 0,90, respectivamente.

Todos los animales fueron manipulados de acuerdo a las pautas establecidas en la Directiva de la Comunidad Europea 2010/63/EU para la investigación animal, y todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

2. Microscopía electrónica tridimensional

Se obtuvieron muestras tridimensionales de la corteza somatosensorial mediante el uso de un microscopio de doble haz (Crossbeam® Neon40 EsB, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania), conocido como FIB/SEM por sus siglas en inglés (*Focused Ion Beam/Scanning Electron Microscope*). Este microscopio combina un microscopio electrónico de barrido (SEM) que escanea la superficie de la muestra, y un haz de iones de galio (FIB) que pule la superficie de la muestra eliminando capas de un grosor determinado por el usuario. El uso alternante de ambos haces, puliendo y tomando imágenes de forma consecutiva, puede programarse de manera que permite la obtención de imágenes seriadas de forma automática. Estas series de imágenes pueden posteriormente alinearse y apilarse dando lugar a un bloque de imágenes que representa una muestra tridimensional del tejido (Merchan-Perez *et al.* 2009). En nuestro caso, las imágenes se adquirieron utilizando el detector de electrones retrodispersados a un potencial

de aceleración de 1,8 kV con una resolución de entre 3,7 y 4,5 nm/pixel en el plano xy y 20nm en el plano z (equivalente al grosor de las secciones). El tamaño de las imágenes obtenidas fue de 2048 x 1536 píxeles. El método utilizado para reducir el ruido fue el promediado de líneas de barrido, y el tiempo de adquisición de cada imagen fue de aproximadamente 4 minutos. Estos parámetros fueron escogidos como una solución de compromiso entre la resolución de la imagen, adecuada para identificar los distintos tipos de sinapsis, la amplitud del campo de visión y el tiempo necesario para obtener las series de imágenes.

En total se obtuvieron 29 muestras del neuropilo de las seis capas de la corteza somatosensorial (tres de la capa I, cuatro de la capa II, diez de la capa III, cinco de la capa IV, tres de la capa V y cuatro de la capa VI). Nuestro estudio se centró en el neuropilo, por lo que no se usaron bloques que contuvieran cuerpos celulares o vasos sanguíneos. Se obtuvieron entre 189 y 363 secciones por bloque (una media de 254,66 secciones por bloque) y un total de 7385 secciones.

3. Identificación de las sinapsis y sus dianas postsinápticas

Las sinapsis fueron visualizadas y segmentadas en tres dimensiones con el software EspINA, (Morales *et al.* 2011). Las densidades pre y postsinápticas aparecen como estructuras electrodensas al microscopio electrónico. Tras aplicar un filtro gaussiano para eliminar los píxeles que introducen ruido, el algoritmo de segmentación utiliza un umbral de grises para extraer todos los vóxeles que se encuentran dentro del nivel de gris que comprende la sinapsis, creando un volumen que incluye tanto

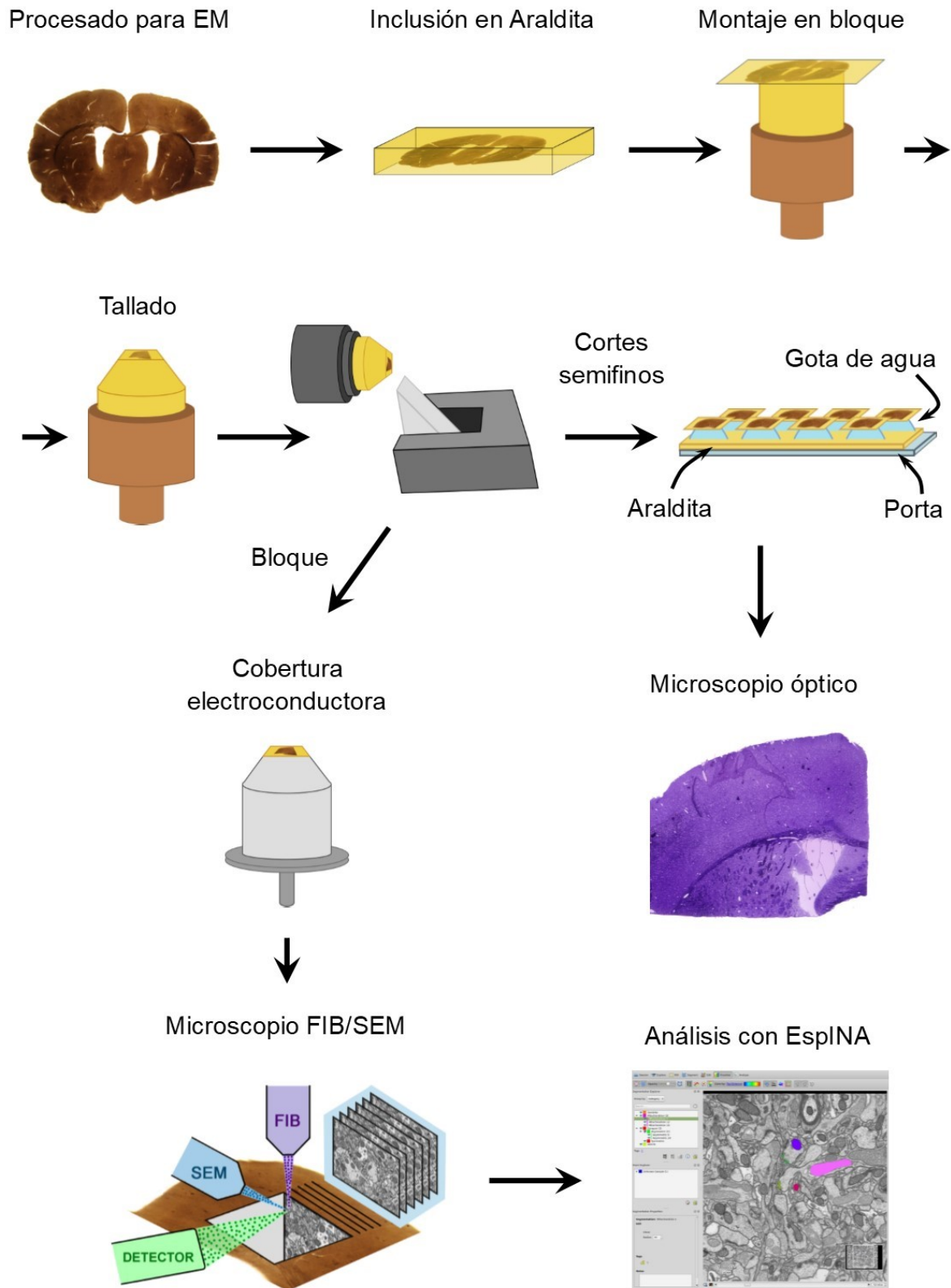


Figura 17. Protocolo de preparación del tejido para microscopía electrónica tridimensional FIB/SEM.

la densidad presináptica como la postsináptica (Morales *et al.* 2013).

Las sinapsis se clasificaron como asimétricas si la densidad postsináptica era de mayor grosor que la presináptica y como simétricas si ambas densidades tenían un grosor similar (Peters *et al.* 1991). Para determinar si la estructura con la que se establecía cada sinapsis era una espina o un tallo dendrítico se utilizó EspINA para recorrer el volumen tridimensional y así poder identificar las estructuras implicadas en la sinapsis. La identificación inequívoca de una espina dendrítica requiere que esté completa y que pueda seguirse visualmente hasta el tallo dendrítico del que emerge. Los tallos dendríticos también deben seguirse dentro del bloque tridimensional para establecer su identidad basándose en su longitud y calibre. Cuando el elemento postsináptico se encontraba muy próximo a los bordes del bloque y estaba truncado, su identidad no pudo ser determinada. Por lo tanto, las dianas de las sinapsis se clasificaron en tres categorías: espinas, tallos dendríticos y truncadas (no identificadas). En el caso de las espinas, también se identificó si la sinapsis se realizaba en la cabeza o en el cuello, y si la misma espina establecía una o varias sinapsis.

En los casos en los que las sinapsis se establecían en un tallo dendrítico, también se determinó si éste tenía o no espinas dendríticas. Si poseía espinas consideramos que pertenecía a una neurona piramidal, salvo en la capa IV, donde otras neuronas como las estrelladas también presentan espinas. En el caso de que la dendrita careciese de espinas consideramos que podría pertenecer a una neurona carente realmente de espinas (como las interneuronas inhibitorias) o pertenecer a un segmento de una neurona espinosa que no tuviese espinas dentro del volumen estudiado.

4. Extracción de la superficie de aposición sináptica

Puesto que las densidades pre y postsinápticas están en aposición y su superficie es muy similar (Schikorski y Stevens 1997, Schikorski y Stevens 1999), pueden ser simplificadas en una única superficie, conocida como superficie de aposición sináptica (SAS). Ésta se puede extraer automáticamente de la segmentación tridimensional de la sinapsis (Morales *et al.* 2013) utilizando el software EspINA.

EspINA también proporciona el área y el perímetro de las SAS. Dado que las SAS se adaptan a la curvatura de la sinapsis, también se ha medido dicha curvatura como 1 menos el cociente entre el área proyectada de la SAS y el área de la SAS. Esta medida es igual a 0 en una SAS completamente plana, e incrementa su valor hasta 1 a medida que la curvatura aumenta.

Las SAS se visualizaron para identificar la presencia de perforaciones y hendiduras de manera que las sinapsis se clasificaron como maculares, en herradura o perforadas.

5. Estereología de las mitocondrias

La cantidad de mitocondrias presentes en el tejido se midió como la fracción de volumen mitocondrial (Vm) en el neuropilo. El método de Cavalieri, basado en el principio de Delesse (Gundersen *et al.* 1988, Tang *et al.* 1997), consiste en superponer sobre las imágenes una gradilla de puntos con un área asociada conocida. El número de puntos que tocan el objeto de interés (en este caso, las mitocondrias) dividido entre el número total de puntos que se encuentran en el área de

referencia (en este caso, el neuropilo) es proporcional a la fracción de volumen ocupada por el objeto (Gundersen *et al.* 1988). Este análisis se realizó con el conjunto de herramientas “Stereology” del software Image J (Mironov 2017), asociando un área por punto de 250.000nm^2 (Figura 18) y analizando una de cada 10 imágenes ($z=200\text{nm}$). Se han analizado un total de 752 imágenes (79 de capa I, 94 de capa II, 253 de capa III, 122 de capa IV, 92 de capa V y 112 de capa VI). Además, se han calculado los coeficientes de variación y error para asegurar la fiabilidad de los datos obtenidos. Los parámetros utilizados en el método de Cavalieri fueron elegidos tras realizar un estudio piloto (véase Broskey *et al.* (2013) para una descripción detallada de la metodología).

Además de cuantificar la fracción de volumen mitocondrial en el neuropilo, se ha analizado la localización de estas mitocondrias en los compartimentos neuronales (dendríticos o axónicos) y no sinápticos. Los puntos que tocaban mitocondrias situadas en elementos

postsinápticos fueron clasificados como “dendríticos” mientras que aquellos que tocaban mitocondrias localizadas en prolongaciones presinápticas o mielinizadas se clasificaron como “axónicos”. Los puntos que tocaban mitocondrias situadas en prolongaciones que no realizaban sinapsis y carecían de mielina se clasificaron como mitocondrias en elementos no sinápticos.

6. Análisis estadístico

Para estudiar si hay diferencias estadísticamente significativas entre todos los parámetros descritos se han realizado comparaciones entre distintos grupos. Para comprobar la normalidad y la homocedasticidad de los datos se han usado los test de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Cuando los datos cumplieron estos criterios se realizó el test de la t de Student. Cuando los datos no cumplían los criterios de normalidad e igualdad de varianzas se realizó el test de Kruskal-Wallis, y cuando éste dio significativo se realizó a continuación

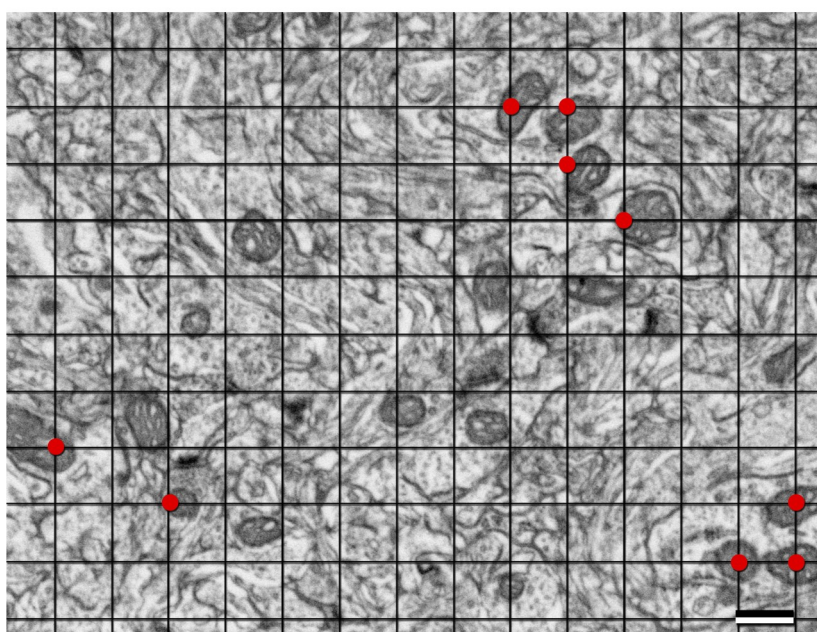


Figura 18. Método de Cavalieri. Se superpone una gradilla sobre la imagen. El número de intersecciones que tocan mitocondrias (puntos rojos) se divide por el número total de intersecciones. Este cociente es proporcional a la fracción de volumen ocupada por las mitocondrias en el neuropilo.

la comparación por parejas con el test de Mann-Whitney. Para analizar las tablas de contingencia se utilizó el test de la χ^2 . Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (IBM Corp. Publicado en 2013. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 22.0.

Armonk, NY: IBM Corp). Para la búsqueda de las distribuciones que mejor se ajustaban a las funciones de densidad de probabilidad se utilizó el programa EasyFit Professional 5.5 (MathWave Technologies).

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden dividir en tres bloques principales: (1) estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo de la corteza somatosensorial de la rata, (2) estudio del tamaño y la forma de dichas sinapsis y (3) estudio de la distribución de las mitocondrias, así como su relación con las sinapsis en el tejido mencionado.

1. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo

1.1 Distribución de sinapsis en espinas y tallos dendríticos

En estas muestras se identificaron un total de 7.567 sinapsis distribuidas por todas las capas corticales. De éstas se descartaron 1.383 (18,28%) puesto que las estructuras postsinápticas estaban truncadas por los bordes del bloque tridimensional de tejido y era imposible identificar si se trataba de espinas o de tallos dendríticos. Por lo tanto, se analizaron 6.184 sinapsis cuyas dianas postsinápticas fueron claramente identificadas (Figura 19). La proporción de sinapsis asimétricas en las muestras varió entre el 87,29% en capa IV y el 94,11% en la capa II (media 90,28%). Por tanto, las proporciones de sinapsis simétricas variaron entre el 12,71% en la capa IV y el 5,89% en la capa II (media 9,72%) (Tabla 1 y Figura 20A). Aunque las proporciones de sinapsis asimétricas y simétricas variaron entre las capas corticales, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (test de Kruskal Wallis, KW, $p=0,05$). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las capas supragranulares (considerando las capas I, II y III juntas) con las capas granular e infragranulares (capas IV, V y VI juntas) (KW, $p=0,08$).

El análisis de la diana postsináptica mostró que la proporción de sinapsis establecidas sobre espinas dendríticas varió entre el 74,36% en la capa VI y el 86,57% en la capa II (media 78,20%). Las sinapsis restantes (media 21,80%) se establecieron sobre tallos dendríticos. Para las sinapsis asimétricas, la proporción de sinapsis establecidas sobre espinas varió entre el 79,80% en la capa VI y el 90,56% en la capa II (media 83,61%). El resto de las sinapsis asimétricas (media 16,40%) se establecieron sobre tallos dendríticos. Esto contrasta con la distribución de las sinapsis simétricas, para las que la mayor proporción de sinapsis se encontró sobre los tallos dendríticos (media 74,53%), variando entre 62,18% en capa IV a 85,88% en capa III. Alrededor de un cuarto de las sinapsis simétricas (25,47%) se establecieron sobre espinas (Tabla 1, Figura 20 B y C y Figura 21). También se analizaron las posibles diferencias entre capas en cuanto a las proporciones de sinapsis asimétricas y simétricas y sus dianas. Se encontraron diferencias significativas sólo en la distribución de sinapsis asimétricas en espinas y tallos dendríticos entre las capas II (donde la proporción de sinapsis asimétricas en espinas fue la más alta) y VI (donde la proporción de sinapsis asimétricas en espinas fue la más baja) (Test de Mann-Whitney, MW, $p<0,05$), como se muestra en la Figura 20 B y C. El análisis de las sinapsis axoespinosas mostró que la mayoría de ellas (97,02%) se localizaron en la cabeza de la espina mientras que únicamente el 2,98% se localizaron en el cuello (Tabla 1, Figura 21).

En resumen, la mayoría de las sinapsis en el neuropilo fueron sinapsis asimétricas axoespinosas, seguidas de asimétricas establecidas en tallos dendríticos, simétricas en tallos dendríticos y simétricas axoespinosas (Tabla 1, Figura 20, Figura 21). Dado que las sinapsis asimétricas superan numéricamente a las simétricas en una proporción de 9:1, y que

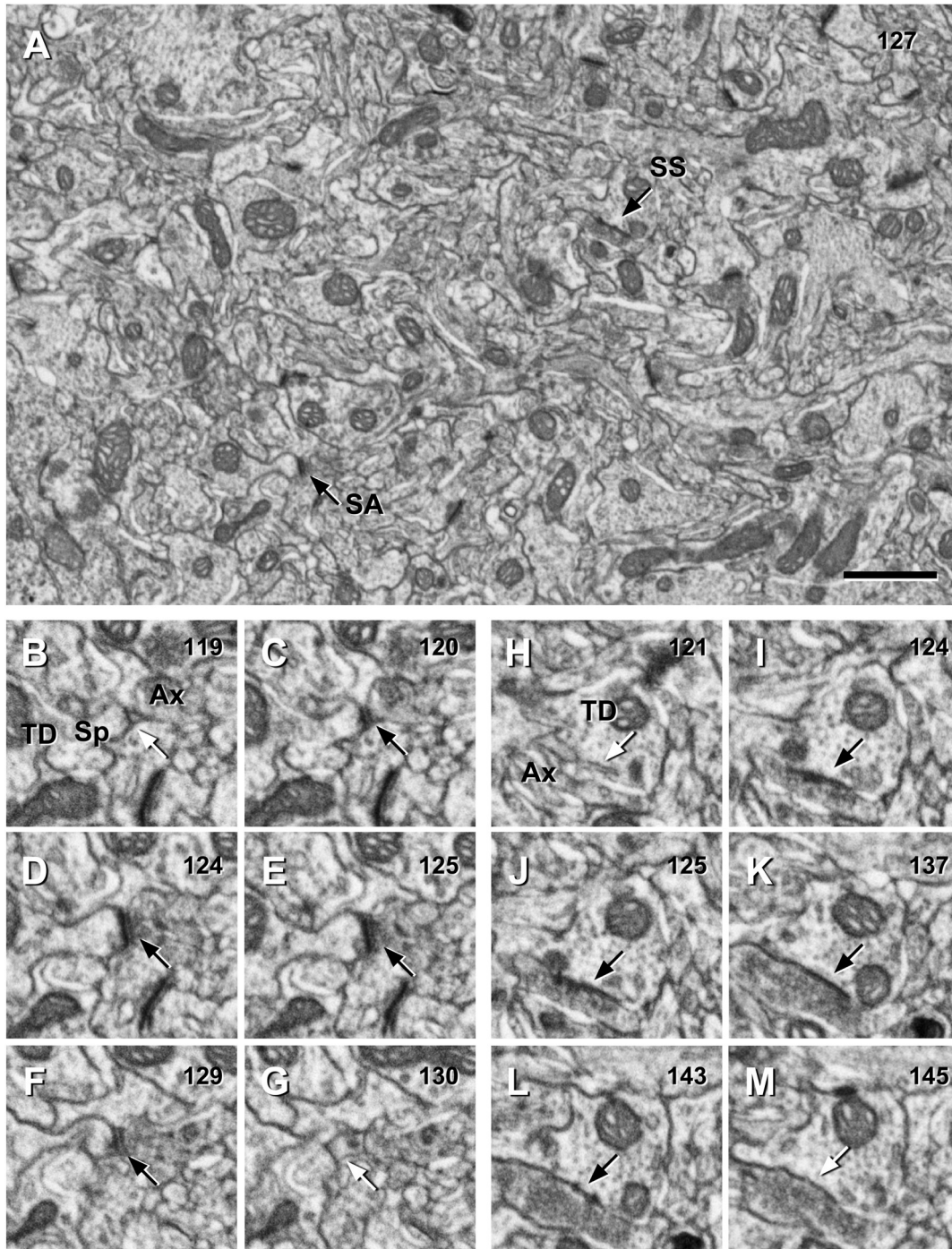


Figura 19. Imágenes seriadas obtenidas con un microscopio de doble haz (FIB/SEM). En este ejemplo se tomaron 275 imágenes seriadas a una resolución de 5nm/píxel en los ejes x e y, y 20nm en el eje z. **(A)** Imagen de la sección nº127, donde se pueden identificar numerosas sinapsis. Dos de ellas se han seleccionado (flechas negras) como ejemplo de una sinapsis asimétrica (SA) y otra simétrica (SS). La SA tiene una PSD prominente, mientras que en la SS es fina, con un grosor muy similar a la de la zona presináptica. Nótese que la identificación de la sinapsis no se realiza en una única imagen sino que se determina tras el análisis de una secuencia de imágenes en las que la sinapsis es visible (los números en la esquina superior derecha indican el número de sección). Por ejemplo, la SA aún no es visible en **(B)** (flecha blanca), está presente desde **(C)** hasta **(F)** (flechas negras) y desaparece nuevamente en **(G)**. La secuencia de la SS se muestra en **(H-M)**. Ax: Axón; TD: Tallo dendrítico; Sp: Espina. La barra de escala en **(A)** indica 1 μm en **(A)** y 556 nm en **(B-M)**.

	Capa						Media (I - VI)
	I	II	III	IV	V	VI	
SA en cabezas de espinas	70,95 (425)	84,09 (814)	76,51 (1671)	69,93 (858)	72,71 (477)	69,27 (381)	73,91%
SA en cuellos de espinas	1,17 (7)	1,14 (11)	1,97 (43)	2,20 (27)	1,52 (10)	1,82 (10)	1,64%
SA en tallos dendríticos	15,36 (92)	8,88 (86)	13,74 (300)	15,16 (186)	17,23 (113)	18,00 (99)	14,73%
SS en cabezas de espinas	2,50 (15)	0,72 (7)	0,82 (18)	4,24 (52)	0,91 (6)	2,55 (14)	1,96%
SS en cuellos de espinas	1,50 (9)	0,62 (6)	0,27 (6)	0,57 (7)	0,46 (3)	0,73 (4)	0,69%
SS en tallos dendríticos	8,51 (51)	4,55 (44)	6,68 (146)	7,91 (97)	7,16 (47)	7,64 (42)	7,08%
Total	100 (599)	100 (968)	100 (2184)	100 (1227)	100 (656)	100 (550)	

Tabla 1. Distribución de sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS) en espinas y tallos dendríticos. Las sinapsis en espinas se han subdividido en aquellas establecidas en la cabeza de la espina y aquellas situadas en el cuello. Se expresan los porcentajes (negrita) y los valores absolutos (en paréntesis) de las sinapsis estudiadas para cada una de las seis capas de la corteza (I-VI). Los valores medios aparecen en la columna de la derecha.

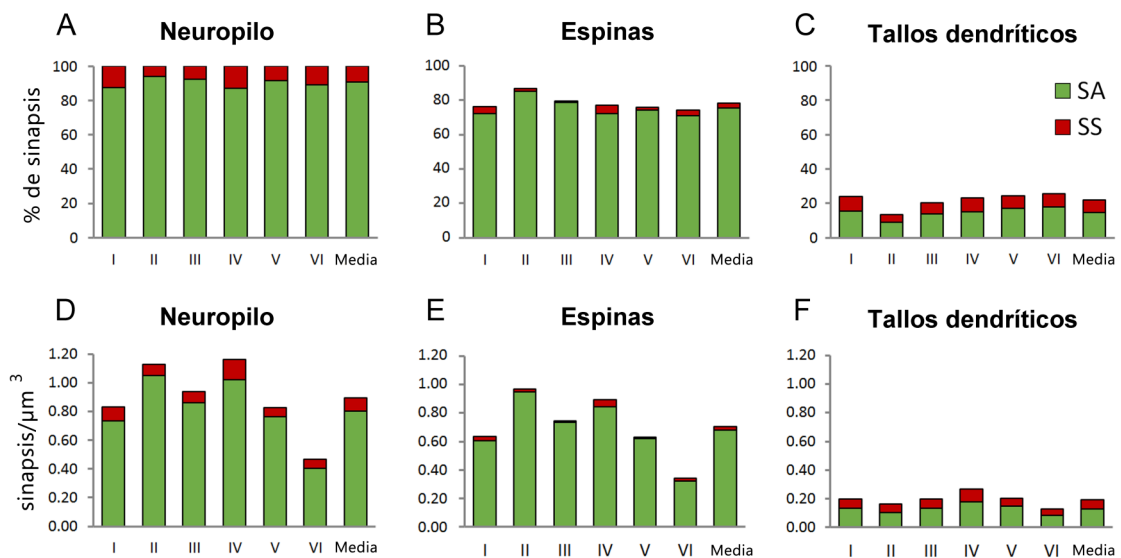


Figura 20. Proporciones de sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS) en el neuropilo y su distribución en espinas y tallos dendríticos. (A) Porcentaje de SA (verde) y SS (rojo) en el neuropilo de las seis capas corticales y su media. Los porcentajes de SA y SS en espinas y tallos dendríticos se muestran en (B) y (C) respectivamente. Las SA en espinas predominan en todas las capas, seguidas de SA en tallos dendríticos, SS en tallos dendríticos y por último SS en espinas. Se encontraron diferencias estadísticas significativas únicamente entre SA en espinas en capas II y VI (test de Mann Whitney, $p < 0.05$). (D) Densidad de SA y SS en el neuropilo de las seis capas corticales y su media, medido como el número de sinapsis por μm^3 . La densidad de SA y SS en espinas y tallos dendríticos se muestran en (E) y (F) respectivamente. La capa VI presentó la menor densidad de sinapsis tanto para las SA como las SS.

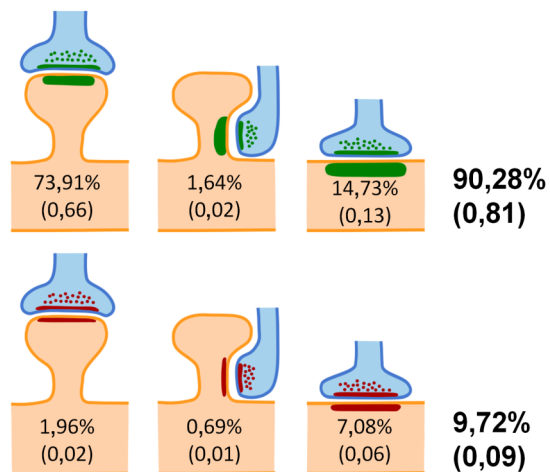


Figura 21. Representación esquemática de la distribución de sinapsis asimétricas (verde) y simétricas (rojo) en espinas y tallos dendríticos. Las sinapsis en espinas se han dividido en aquellas localizadas sobre la cabeza de la espina y aquellas localizadas en el cuello. Los porcentajes representan la media de las seis capas de la corteza. Los valores entre paréntesis representan la densidad por μm^3 de cada tipo de sinapsis en el neuropilo. Véase también la Tabla 1.

las sinapsis axoespinosas superan a las sinapsis en tallos dendríticos en una proporción de 8:2, podría argumentarse que las diferencias encontradas entre las sinapsis asimétricas y las simétricas podrían ser fruto del azar. Para descartar dicha posibilidad, se crearon tablas de contingencia de 2x2 en las que se compararon ambos tipos de sinapsis contra el tipo de diana postsináptica en cada capa cortical (Tabla 2). En estas tablas se calcularon los valores esperados para las sinapsis asimétricas y las simétricas a partir de los totales marginales, asumiendo la hipótesis nula de que no hay asociación entre el tipo de sinapsis y la diana postsináptica. En otras palabras, la hipótesis nula asume que las sinapsis asimétricas y simétricas no tienen preferencia por las espinas o los tallos. En general, para cualquier tabla de contingencia, la frecuencia esperada para una celda en la fila i y la columna j es $E_{ij} = T_i \cdot T_j / T$ donde T_i es el total marginal para la fila i , T_j es el total marginal de la columna j y T es el número total de observaciones. Se aplicó el test de asociación χ^2 a estas tablas. Los resultados indicaron que la hipótesis nula debía ser rechazada en todas las capas ($p < 0,0001$). De hecho, si las sinapsis simétricas estuviesen distribuidas aleatoriamente entre espinas y tallos, habrían sido más frecuentes en espinas que en tallos, aunque ocurre lo contrario. Por ejemplo, en la capa II el valor esperado de sinapsis simétricas establecidas en tallos dendríticos si se

cumpliese la hipótesis nula sería de $(57 \times 130 / 968 = 7,65)$, véase Tabla 2). Sin embargo, el valor real es 44, es decir, 5,75 veces superior a lo esperado. De hecho, la proporción de sinapsis simétricas establecidas sobre tallos dendríticos fue siempre muy superior a la esperada si fuese por azar (de 2,7 veces mayor en capa IV a 5,75 en capa II; Tabla 2). Esto sugiere que las sinapsis simétricas muestran preferencia por los tallos dendríticos. No obstante, el método que hemos utilizado no nos proporciona información acerca de los posibles mecanismos implicados. Por último, la proporción de sinapsis asimétricas que se establecen sobre espinas es solo de 1,05 a 1,8 veces superior a lo que se esperaría si la distribución fuese al azar (Tabla 2).

1.2 Distribución de sinapsis sobre tallos dendríticos de neuronas con y sin espinas

Como se ha mencionado más arriba, el 21,80% de las sinapsis se localizan sobre tallos dendríticos. A continuación, se trató de esclarecer si estos tallos pertenecían a neuronas con espinas (principalmente piramidales y estrelladas) o a neuronas sin espinas (principalmente interneuronas inhibitorias). Para ello, una vez se identifica una sinapsis en el tallo dendrítico, este se sigue a lo largo de la serie de imágenes para determinar si

Capa I		Tipo de diana postsináptica		
		Espina	Tallo	Totales
Tipo de sinapsis	SA	432 (398,9)	92 (125,1)	524
	SS	24 (57,1)	51 (17,9)	75
Totales		456	143	599

Capa II		Tipo de diana postsináptica		
		Espina	Tallo	Totales
Tipo de sinapsis	SA	825 (788,65)	86 (122,35)	911
	SS	13 (49,35)	44 (7,65)	57
Totales		838	130	968

Capa III		Tipo de diana postsináptica		
		Espina	Tallo	Totales
Tipo de sinapsis	SA	1714 (1602,72)	300 (411,28)	2014
	SS	24 (135,28)	146 (34,72)	170
Totales		1738	446	2184

Capa IV		Tipo de diana postsináptica		
		Espina	Tallo	Totales
Tipo de sinapsis	SA	885 (823,98)	186 (247,02)	1071
	SS	59 (120,02)	97 (35,98)	156
Totales		944	283	1227

Capa V		Tipo de diana postsináptica		
		Espina	Tallo	Totales
Tipo de sinapsis	SA	487 (453,66)	113 (146,34)	600
	SS	9 (42,34)	47 (13,66)	56
Totales		496	160	656

Capa VI		Tipo de diana postsináptica		
		Espina	Tallo	Totales
Tipo de sinapsis	SA	391 (364,38)	99 (125,62)	490
	SS	18 (44,62)	42 (15,38)	60
Totales		409	141	550

Tabla 2. Tablas de contingencia mostrando el tipo de sinapsis y el tipo de diana postsináptica en todas las capas corticales. Los recuentos de sinapsis observados en cada subcategoría (en negrita) se tomaron de la Tabla 1, los valores esperados (en paréntesis) se calcularon a partir de los totales marginales asumiendo la hipótesis nula de que no hay asociación entre el tipo de sinapsis y el tipo de diana postsináptica. El test de la χ^2 se aplicó a estas tablas, poniendo de manifiesto que la hipótesis nula debía de ser rechazada en todos los casos ($p < 0,0001$).

posee espinas o no. Si se encuentran espinas se concluye que pertenece a una neurona con espinas. No obstante, en el caso de que no posea espinas no se puede concluir con absoluta certeza que pertenezca a una neurona sin espinas, puesto que podría ser un segmento dendrítico de una neurona con espinas que no presente espinas en el volumen analizado. En este estudio se encontró que al menos el 58,92% de las sinapsis sobre tallos dendríticos (el 12,86% de todas las sinapsis) se establecieron sobre neuronas con espinas. El porcentaje de sinapsis establecidas en tallos de dendritas con espinas fue ligeramente superior para las sinapsis asimétricas (59,93%) que para las simétricas (56,09%), aunque esta diferencia no fue significativa (χ^2 , $p=0,30$). En el 41,02% restante de sinapsis que se establecieron en tallos dendríticos (8,94% de todas las sinapsis), los segmentos dendríticos no presentaron ninguna espina en el volumen estudiado. Por tanto, dado que el 78,20% de las sinapsis fueron axoespinosas y que un 12,86% adicional se establecen sobre tallos con espinas, se puede concluir que al menos el 91,06% de las sinapsis se establecen con neuronas con espinas. El porcentaje exacto de sinapsis sobre neuronas sin espinas no se puede determinar sin ambigüedad con esta metodología, pero en cualquier caso sería menor o igual al 8,94%.

1.3 Densidad de sinapsis asimétricas y simétricas en espinas y tallos dendríticos

Para estimar la densidad de sinapsis en cada serie de imágenes, contamos el número de sinapsis dentro de un marco de recuento no sesgado de volumen conocido (véase el Capítulo III. Materiales y Métodos). La densidad media de sinapsis en la corteza fue de 0,89 sinapsis/ μm^3 . Por capas, la densidad total de sinapsis (sinapsis asimétricas + simétricas) y de sinapsis asimétricas fue más alta en las capas II y IV y

alcanzó el valor mínimo en la capa VI (Figura 20 D, Tabla 3, Tabla 4). La comparación por parejas confirmó que la densidad total de sinapsis y de sinapsis asimétricas era menor en el neuropilo de la capa VI que en las capas II y IV (MW, $p<0,05$). Respecto a las sinapsis simétricas, la densidad fue mayor en la capa IV y menor en la capa VI, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre ambas (MW, $p<0,05$) (Figura 20 D, Tabla 3, Tabla 4).

Las densidades de sinapsis asimétricas y simétricas en espinas y tallos dendríticos se han calculado a partir de las estimaciones no sesgadas de las densidades de sinapsis asimétricas y simétricas y de las proporciones de sinapsis establecidas en espinas y tallos dendríticos (Figura 20 E y F, Tabla 4). La densidad de sinapsis asimétricas en espinas alcanzó su máximo en las capas II y IV y su mínimo en la capa VI (MW, $p<0,05$). La densidad de sinapsis asimétricas sobre tallos dendríticos fue más alta en la capa IV, y más baja en las capas II y VI (MW, $p<0,05$). Respecto a las sinapsis simétricas en espinas, la densidad más alta se encontró en la capa IV y la más baja en las capas III y V (MW, $p<0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las capas en cuanto a la localización de sinapsis simétricas en tallos dendríticos (KW, $p=0,11$).

1.4 Espinas con múltiples sinapsis

En nuestras muestras de tejido, el 94,43% de las espinas establecieron una sola sinapsis, mientras que el 5,57% restante estableció dos o tres sinapsis. En ningún caso se encontraron más de tres sinapsis en la misma espina (Tabla 5).

Cuando las espinas establecieron una única sinapsis, en el 98,65% de los casos ésta fue asimétrica, y sólo en el 1,35% se trató de una simétrica. Cuando una espina presentó varias sinapsis, en el 79,28% de los casos éstas fueron

Capa	Muestra	Animal	Nº de secciones	Grosor de la sección (nm)	Resolución (nm/pixel)	Volumen total (μm^3)	Volumen del MR (μm^3)	Nº de SA	Nº de SS	Nº de sinapsis	SA ($\text{sin}/\mu\text{m}^3$)	SS ($\text{sin}/\mu\text{m}^3$)	AS+SS ($\text{sin}/\mu\text{m}^3$)
I	1	w33	267	20	3,69	312,93	210,62	161	19	180	0,7644	0,0902	0,8546
	2	w35	301	20	3,72	358,54	177,20	111	17	128	0,6264	0,0959	0,7224
	3	w31	202	20	3,72	240,61	167,38	136	19	155	0,8125	0,1135	0,9260
II	1	w33	263	20	3,69	308,24	224,35	211	19	230	0,9405	0,0847	1,0252
	2	w35	189	20	3,72	225,13	139,51	117	10	127	0,8387	0,0717	0,9103
	3	w35	237	20	3,72	282,30	149,03	195	11	206	1,3085	0,0738	1,3823
	4	w31	239	20	3,72	284,68	213,91	239	18	257	1,1173	0,0841	1,2014
III	1	w31	223	20	3,69	261,36	149,13	135	12	147	0,9053	0,0805	0,9857
	2	w31	210	20	3,69	246,12	157,15	101	8	109	0,6427	0,0509	0,6936
	3	w33	214	20	3,69	250,81	186,45	158	15	173	0,8474	0,0805	0,9279
	4	w33	213	20	3,69	249,64	176,44	157	21	178	0,8898	0,1190	1,0088
	5	w33	324	20	3,69	379,73	176,28	148	19	167	0,8396	0,1078	0,9474
	6	w33	219	20	3,69	256,67	175,55	156	9	165	0,8886	0,0513	0,9399
	7	w33	219	20	3,69	256,67	191,28	171	18	189	0,8940	0,0941	0,9881
	8	w35	363	20	3,72	432,39	247,58	186	12	198	0,7513	0,0485	0,7997
	9	w35	247	20	3,72	294,21	178,40	191	10	201	1,0706	0,0561	1,1267
	10	w35	258	20	3,72	307,32	165,06	152	16	168	0,9209	0,0969	1,0178
IV	1	w33	235	20	3,69	275,42	154,59	148	24	172	0,9574	0,1552	1,1126
	2	w35	211	20	3,72	251,33	158,38	190	15	205	1,1996	0,0947	1,2943
	3	w35	224	20	3,72	266,82	183,65	151	17	168	0,8222	0,0926	0,9148
	4	w35	253	20	3,72	301,36	140,63	143	35	178	1,0168	0,2489	1,2657
	5	w35	263	20	3,72	313,27	123,81	144	18	162	1,1631	0,1454	1,3084
V	1	w33	319	20	3,69	373,87	165,62	108	9	117	0,6521	0,0543	0,7064
	2	w33	282	20	3,69	330,51	218,01	181	17	198	0,8302	0,0780	0,9082
	3	w33	310	20	3,69	363,32	207,95	162	13	175	0,7790	0,0625	0,8416
VI	1	w33	253	20	3,69	296,52	185,32	84	8	92	0,4533	0,0432	0,4964
	2	w35	285	20	3,72	339,48	183,55	70	15	85	0,3814	0,0817	0,4631
	3	w31	270	20	3,72	321,61	179,97	88	14	102	0,4890	0,0778	0,5668
	4	w31	292	20	4,50	508,96	280,09	92	15	107	0,3285	0,0536	0,3820
Totales						912,07	555,19	408	55	463	0,7349	0,0991	0,8339
						1100,35	726,80	762	58	820	1,0484	0,0798	1,1282
						2934,92	1803,32	1555	140	1695	0,8623	0,0776	0,9399
						1408,20	761,07	776	109	885	1,0196	0,1432	1,1628
						1067,70	591,58	451	39	490	0,7624	0,0659	0,8283
						1466,57	828,92	334	52	386	0,4029	0,0627	0,4657

Tabla 3. Densidad de sinapsis asimétricas y simétricas en las seis capas de la corteza. Capas corticales (I-VI), número de muestras por capa, identificador del animal y datos referentes a cada muestra.

	Capa						
	I	II	III	IV	V	VI	Media
Densidad de sinapsis (SA+SS)	0,83	1,13	0,94	1,16	0,83	0,47	0,89
Porcentaje de sinapsis en espinas	76,13	86,57	79,58	76,94	75,61	74,36	78,20
Porcentaje de sinapsis en tallos dendr.	23,87	13,43	20,42	23,06	24,39	25,64	21,80
Densidad de sinapsis en espinas	0,63	0,98	0,75	0,89	0,63	0,35	0,70
Densidad de sinapsis en tallos dendr.	0,20	0,15	0,19	0,27	0,20	0,12	0,19
Densidad de SA	0,73	1,05	0,86	1,02	0,76	0,40	0,81
Porcentaje de SA en espinas	82,44	90,56	85,10	82,63	81,17	79,80	83,62
Porcentaje de SA en tallos dendríticos	17,56	9,44	14,90	17,37	18,83	20,20	16,38
Densidad de SA en espinas	0,61	0,95	0,73	0,84	0,62	0,32	0,68
Densidad de SA en tallos dendríticos	0,13	0,10	0,13	0,18	0,14	0,08	0,13
Densidad de SS	0,10	0,08	0,08	0,14	0,07	0,06	0,09
Porcentaje de SS en espinas	32,00	22,81	14,12	37,82	16,07	30,00	25,47
Porcentaje de SS en tallos	68,00	77,19	85,88	62,18	83,93	70,00	74,53
Densidad de SS en espinas	0,03	0,02	0,01	0,05	0,01	0,02	0,02
Densidad de SS en tallos dendríticos	0,07	0,06	0,07	0,09	0,06	0,04	0,06

Tabla 4. Densidad de sinapsis en el neuropilo. La densidad de sinapsis (n° de sinapsis/ μm^3) y el porcentaje de sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS) en espinas y tallos dendríticos en el neuropilo de las seis capas de la corteza (I - VI). Los valores medios se dan en la columna de la derecha.

	Recuento	%
Espinas con una sola sinapsis	4304	94,43
Una SA	4246	98,65
Una SS	58	1,35
Espinas con múltiples sinapsis	254	5,57
Dos SA	146	57,48
Una SA y una SS	84	33,07
Dos SA y una SS	9	3,54
Tres SA	6	2,36
Dos SS	6	2,36
Tres SS	2	0,79
Una SA y dos SS	1	0,39

Tabla 5. Espinas que establecen una o múltiples sinapsis. El 94,43% de la población total de espinas estudiadas establecieron una única sinapsis. El 5,57% restante estableció varias sinapsis. Para esta segunda población se detallan los porcentajes de las diferentes combinaciones de múltiples sinapsis. SA, sinapsis asimétricas; SS, sinapsis simétricas.

asimétricas, mientras que las simétricas correspondieron al 20,72% restante, es decir, la proporción de sinapsis inhibitoras aumentó cuando la espina recibió más de una sinapsis. Las espinas con dos sinapsis asimétricas fueron la combinación más común (57,48%), seguidas de las espinas con una sinapsis asimétrica y una simétrica (33,07%). Las espinas con otras combinaciones de sinapsis asimétricas y simétricas fueron mucho menos abundantes, representando menos del 10% del total de espinas con múltiples sinapsis (Tabla 5). Desde otra perspectiva, del número total de espinas con sinapsis múltiples, casi dos tercios (63,39%) establecieron más sinapsis asimétricas que simétricas, aproximadamente un tercio (33,07%) presentaron el mismo número de sinapsis asimétricas que de simétricas y un número muy reducido (3,54%) presentó más sinapsis simétricas que asimétricas. La proporción de espinas con múltiples sinapsis no varió entre las distintas capas de la corteza (KW, $p=0,95$).

Respecto a la localización de las sinapsis en la cabeza o el cuello de las espinas, cuando una espina formó una única sinapsis, en la inmensa mayoría de los casos (97,54%) ésta fue una sinapsis asimétrica localizada en la cabeza, en el 1,09% de los casos se trató de una asimétrica localizada en el cuello, el 1,14% correspondió a una simétrica en la cabeza y sólo el 0,23% se trató de una simétrica en el cuello. En el caso de las espinas con varias sinapsis se encontraron varias combinaciones de sinapsis asimétricas y simétricas en cabeza y cuello (Figura 22), siendo las sinapsis en el cuello mucho más frecuentes que en el caso de espinas con sinapsis únicas. De hecho, la proporción de sinapsis asimétricas en el cuello alcanzó el 11,85% (es decir, aproximadamente diez veces mayor que en las espinas con sinapsis únicas), y la proporción de simétricas en el cuello alcanzó el 5,22% (aproximadamente 25 veces más que en las espinas con sinapsis únicas).

2. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis

Tras determinar la distribución de sinapsis en el neuropilo de la corteza somatosensorial de la rata juvenil, se procedió a describir el tamaño y la forma de las sinapsis.

2.1 Área y perímetro de las uniones sinápticas

En este estudio se usaron un total de 7.569 sinapsis distribuidas en todas las capas corticales. De estas se descartaron 678 (8,96%) puesto que la unión sináptica estaba truncada por los bordes de la serie de imágenes tridimensional. Por lo tanto, se analizaron un total de 6.891 sinapsis cuya unión sináptica estaba completa, lo que permitía extraer la superficie de aposición sináptica (SAS) (Figura 23). De estas, 6.259 (90,83%) fueron asimétricas y 632 (9,17%) simétricas.

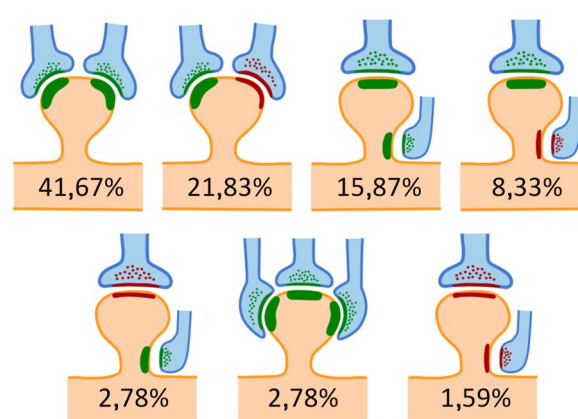


Figura 22. Representación esquemática de las diferentes localizaciones de las sinapsis múltiples en la cabeza y el cuello de las espinas. Las sinapsis asimétricas se representan en verde y las simétricas en rojo. Los porcentajes indican la frecuencia relativa de cada caso respecto al número total de espinas que establecían múltiples sinapsis. Se han representado las combinaciones más frecuentes. Otras combinaciones se encontraron muy raramente y no han sido representadas. Véase también la Tabla 5.

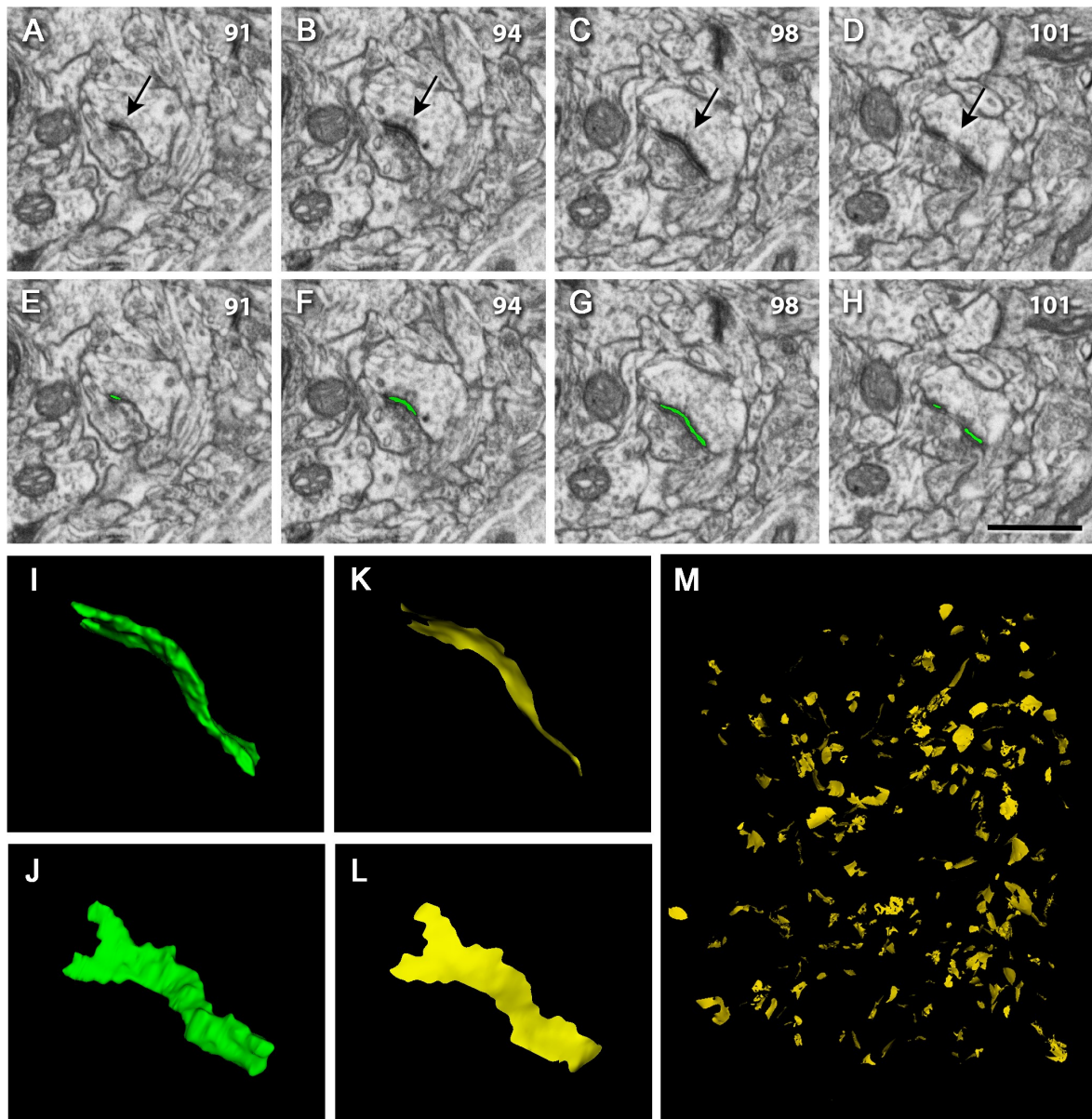


Figura 23. Identificación, segmentación y extracción de la superficie de aposición sináptica (SAS) de una unión sináptica a partir de imágenes seriadas obtenidas con un microscopio FIB/SEM. (A-D) Secciones 91, 94, 98 y 101 de un bloque de imágenes seriadas obtenidas con FIB/SEM de la corteza somatosensorial de la rata. La flecha señala la densidad postsináptica de una sinapsis asimétrica. Nótese que la identificación no se ha basado en imágenes individuales sino en el análisis de una secuencia completa de imágenes donde la sinapsis era visible. Cada sección tiene 20 nm de grosor. **(E-H)** Segmentación de la unión sináptica (verde) con el software EspINA. **(I-J)** El objeto tridimensional que representa la unión sináptica (verde), visualizado desde dos ángulos diferentes. **(K, L)** La SAS (amarillo) extraída de la reconstrucción mostrada en (I) y (J). **(M)** Vista panorámica de todas las SAS extraídas en un bloque completo de imágenes seriadas. Barra de escala en **(H)** = 1 μ m para **(A-H)**.

Las áreas de las SAS variaron entre 909,23 y 556.393,19 nm² para las sinapsis asimétricas y entre 3.388,21 y 631.774,04 nm² para las simétricas. Las áreas medias de las SAS fueron más pequeñas para las sinapsis asimétricas que para las simétricas en todas las capas corticales (Tabla 6, Figura 24 A) y estas diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos (MW, $p < 0,001$ en capas I a V y $p = 0,03$ en capa VI). Para las sinapsis asimétricas, las mayores áreas medias de las SAS se encontraron en la capa III (media \pm error estándar de la media, sem por sus siglas en inglés: *standard error of the mean*; 72.729,58 nm² \pm 1.209,78), y las diferencias entre ésta y las demás capas fueron estadísticamente significativas (MW, $p \leq 0,02$; Tabla 7). Las áreas más pequeñas se encontraron en la capa IV (54.770,81 nm² \pm 1.245,29) y las diferencias entre ésta y las capas I, III y V fueron

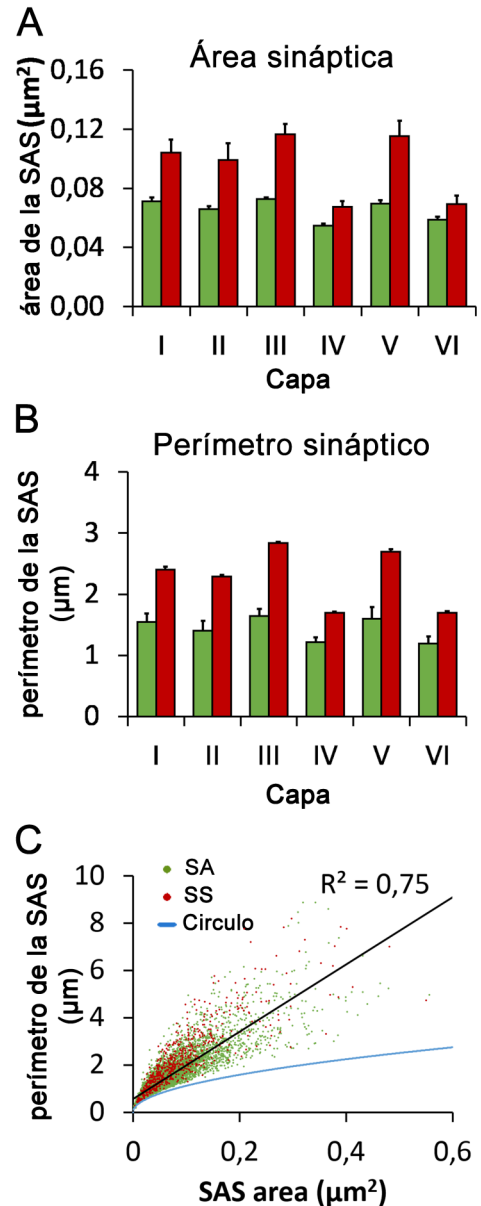
estadísticamente significativas (MW, $p \leq 0,001$; Tabla 8). Para las sinapsis simétricas, las mayores áreas se encontraron también en la capa III (116.703,43 nm² \pm 6.735,43; las diferencias entre ésta y las capas II, IV y VI fueron estadísticamente significativas; MW, $p \leq 0,002$; Tabla 8). Las áreas de sinapsis simétricas más pequeñas se encontraron en la capa IV (68.355,35 nm² \pm 3.896,95) y las diferencias fueron estadísticamente significativas entre ésta y las demás capas, salvo capa VI (MW, $p \leq 0,03$; Tabla 7).

También se midieron los perímetros de las SAS (Tabla 8, Figura 24 B). Las medias de los perímetros de las sinapsis simétricas fueron siempre más grandes que las de las asimétricas en todas las capas (Figura 24 A y B, Tabla 6 y Tabla 8). Como se esperaba, se encontró una fuerte correlación entre el área y el perímetro

Capa	SA				SS			
	Área media de las SAS \pm sem (nm ²)	n	μ	σ	Área media de las SAS \pm sem (nm ²)	n	μ	σ
I	70834,87 \pm 2649,41	594	10,81	0,88	104309,94 \pm 8741,68	77	11,29	0,78
II	58987,37 \pm 1788,36	992	10,72	0,83	87757,53 \pm 8875,47	64	11,14	0,72
III	72729,58 \pm 1209,78	2212	10,93	0,74	116703,42 \pm 6735,43	185	11,42	0,72
IV	54770,81 \pm 1245,29	1200	10,65	0,73	68355,35 \pm 3896,95	172	10,88	0,73
V	69682,16 \pm 2210,41	684	10,85	0,81	113353,40 \pm 10086,08	62	11,41	0,69
VI	58668,28 \pm 2050,82	577	10,73	0,70	69382,12 \pm 5695,64	72	10,90	0,76
I-VI	65299,31 \pm 697,16	6259	10,84	0,79	93384,53 \pm 3001,23	632	11,17	0,78

Tabla 6. Parámetros de la distribución log-normal de las áreas de las superficies de aposición sináptica. Área media de las superficies de aposición sináptica (SAS) (nm² \pm sem), número de SAS analizadas (n), y localización (μ) y escala (σ) de las distribuciones log-normales que mejor se ajustan a la distribución de los datos en las seis capas corticales. También se muestra la media no ponderada de las seis capas. SA, sinapsis asimétricas; SS, sinapsis simétricas.

Figura 24. Área y perímetro de las superficies de aposición sináptica (SAS) (media + sem). (A) Área de las superficies de aposición sináptica (SAS) de sinapsis asimétricas (SA; barras verdes) y simétricas (SS; barras rojas) en las seis capas corticales. Las SA fueron más pequeñas que las SS en todas las capas (MW, $p < 0,001$ en las capas I a V; $p = 0,03$ en capa VI). Tanto para las SA como para las SS, las SAS más grandes se encontraron en la capa III, y las más pequeñas se encontraron en la capa IV. Las comparaciones entre las capas se detallan en la Tabla 7. **(B)** Perímetros de las superficies de aposición sináptica (SAS) de sinapsis asimétricas (SA; barras verdes) y simétricas (SS; barras rojas) en las seis capas corticales. Los perímetros de las SAS mostraron diferencias similares a las de las áreas. Las comparaciones detalladas entre capas se muestran en la Tabla 7. **(C)** Gráfico de dispersión mostrando la relación entre las áreas y los perímetros de las SAS. Las SA se representan como puntos verdes y las SS como puntos rojos. Como referencia se muestra la relación perímetro/área de un círculo (línea azul). Hay una fuerte correlación entre el área y el perímetro de las SAS ($R^2 = 0,75$ para SA y SS juntas, línea negra). Si comparamos la relación perímetro/área de un círculo con la de las SAS, observamos que el perímetro de las SAS crece más rápido que el perímetro de un círculo, indicando que el perímetro de las SAS tiende a hacerse más tortuoso a medida que aumenta su área.



de las SAS ($R^2 = 0,75$ para todas las sinapsis; $R^2 = 0,75$ para sinapsis asimétricas; $R^2 = 0,72$ para sinapsis simétricas) (Figura 24 C). Es también interesante remarcar que cuanto más grande era el área de las SAS, más tortuoso era su perímetro. Esto se puede observar en la Figura 24 C, que muestra que el perímetro de las SAS tiende a crecer más rápidamente que el perímetro de una circunferencia. Un resumen de las comparaciones entre capas se muestra en la Tabla 7. Para caracterizar la distribución de tamaños de las SAS, hicimos un histograma de frecuencias de sus áreas para cada capa y para todas ellas juntas. Para las sinapsis

asimétricas, los histogramas de frecuencias presentaron una forma similar en todas las capas, con una cola larga a la derecha, y solaparon en gran medida. En el caso de las sinapsis simétricas, los histogramas presentaron formas más irregulares, probablemente debido al menor número de estas sinapsis presentes en cada capa (Tabla 6, Figura 25 y Figura 26). A continuación, se realizó un test de bondad de ajuste para encontrar las funciones de densidad de probabilidad teórica que mejor se ajustasen a las distribuciones empíricas de las áreas de las SAS en cada capa, y en todas las capas juntas. Se encontró que el mejor ajuste correspondía a

Área de las SAS, sinapsis asimétricas						
I						
II	0,001					
III	0,001	<0,001				
IV	<0,001	0,916	<0,001			
V	0,271	<0,001	0,023	<0,001		
VI	0,102	0,114	<0,001	0,070	0,001	
	I	II	III	IV	V	VI

Área de las SAS, sinapsis simétricas						
I						
II	0,094					
III	0,394	0,002				
IV	<0,001	0,031	<0,001			
V	0,490	0,018	0,905	<0,001		
VI	0,002	0,143	<0,001	0,767	<0,001	
	I	II	III	IV	V	VI

Perímetro de las SAS, sinapsis asimétricas						
I						
II	0,002					
III	<0,001	<0,001				
IV	<0,001	0,007	<0,001			
V	0,035	<0,001	0,019	<0,001		
VI	<0,001	0,002	<0,001	0,364	<0,001	
	I	II	III	IV	V	VI

Perímetro de las SAS, sinapsis simétricas						
I						
II	0,264					
III	0,054	0,001				
IV	<0,001	0,001	<0,001			
V	0,205	0,021	0,643	<0,001		
VI	<0,001	0,003	<0,001	0,818	<0,001	
	I	II	III	IV	V	VI

Tabla 7. Comparaciones pareadas de las áreas y los perímetros de las superficies de aposición sináptica (SAS) de sinapsis asimétricas y simétricas en las seis capas corticales. Test de Mann-Whitney, se indican los valores de p obtenidos.

la distribución log-normal en todos los casos. Estas distribuciones, con algunas variaciones en los parámetros localización (μ) y escala (σ), se encontraron en todas las capas, tanto para las sinapsis asimétricas como para las simétricas, aunque el ajuste era mejor para las asimétricas, probablemente debido a que el número de simétricas fue mucho menor. El mismo análisis se realizó para los perímetros, encontrándose nuevamente que la función con mejor ajuste para los datos era la log-normal (Tabla 8).

2.2 Tamaño de las uniones sinápticas en espinas y tallos dendríticos.

También se determinó si el elemento postsináptico sobre el que se establecía la sinapsis (espinas o tallo dendrítico) estaba asociado a diferencias en el tamaño de las PSDs. Para este análisis utilizamos 6.000 sinapsis cuyas dianas postsinápticas pudieron ser claramente identificadas. Se encontró que el área media de las SAS localizadas en tallos

dendríticos ($88.795,98 \text{ nm}^2 \pm 2.210,16$) era más grande que el área media de las SAS localizadas en los cuellos de las espinas ($57.879,38 \text{ nm}^2 \pm 3.998,65$) y en las cabezas de las espinas ($65.164,05 \text{ nm}^2 \pm 797,26$) (MW, $p < 0,001$). Ésta diferencia podría deberse al hecho de que las sinapsis simétricas, que son más grandes que las asimétricas, se localizan preferentemente sobre los tallos dendríticos (en nuestra muestra el 73,39% de las sinapsis simétricas se localizaron en los tallos dendríticos, mientras que solamente el 14,61% de las asimétricas se localizaron en las espinas). Para descartar esta posibilidad, se analizaron las sinapsis asimétricas y simétricas de forma independiente. Se encontró que el área media de las sinapsis asimétricas localizadas en tallos ($78.255,07 \text{ nm}^2 \pm 2.413,73$) era mayor que el área media de aquellas localizadas en las cabezas de las espinas ($65.196,81 \text{ nm}^2 \pm 811,93$; MW, $p < 0,001$), y que las localizadas en las cabezas de las espinas eran, de media, más grandes que las localizadas en los cuellos ($52.326,09 \text{ nm}^2 \pm 4.394,36$; MW, $p = 0,04$). De

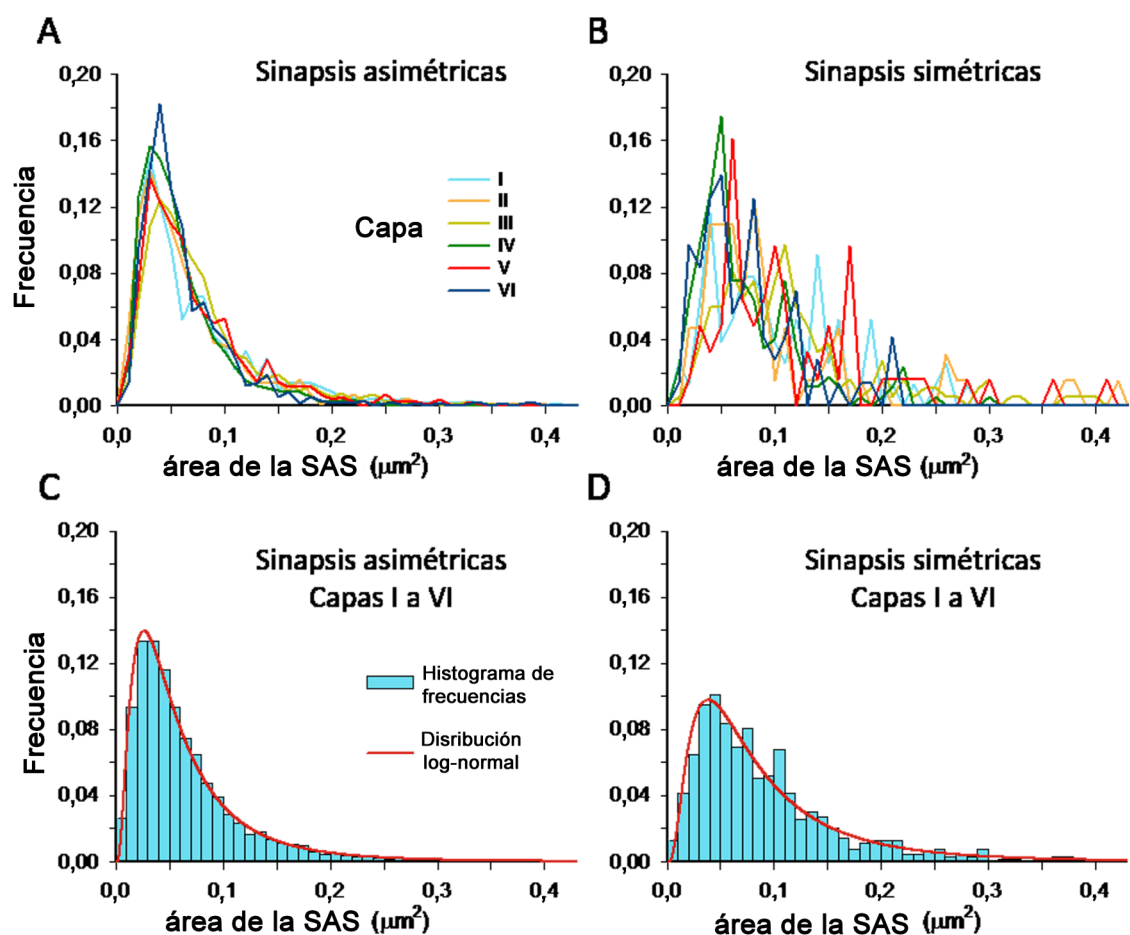


Figura 25. Histogramas de frecuencia de las áreas de las superficies de aposición sináptica y su correspondiente función de densidad de probabilidad teórica. Se representan los histogramas de frecuencias de las áreas de las superficies de aposición sináptica (SAS) en las seis capas corticales para las sinapsis asimétricas **(A)** y simétricas **(B)**. Los histogramas de las sinapsis asimétricas presentaron formas similares en todas las capas y solaparon en gran medida. Por el contrario, los histogramas de las sinapsis simétricas presentaron formas más irregulares. En **(C)** y **(D)** las sinapsis asimétricas y simétricas de todas las capas se han agrupado para construir los histogramas de frecuencias (barras azules). Las funciones de densidad de probabilidad teórica que mejor se ajustan en cada caso se han representado sobre cada histograma con una línea roja; en ambos casos se trata de una log-normal. Los parámetros μ y σ de las distribuciones log-normales se muestran en la Tabla 6.

forma similar, el área media de las SAS de sinapsis simétricas era más grande en los tallos ($109.798,76 \text{ nm}^2 \pm 4.358,62$), comparada con las cabezas de las espinas ($63.808,43 \text{ nm}^2 \pm 3.592,90$) y cuellos ($74.697,93 \text{ nm}^2 \pm 8.576,53$; MW, $p < 0,001$), aunque las diferencias entre las simétricas en la cabeza y el cuello de las espinas no fueron estadísticamente significativas (MW, $p = 0,33$).

En resumen, las sinapsis localizadas en tallos dendríticos fueron de media más grandes que aquellas localizadas en espinas dendríticas, independientemente de si se trataba de sinapsis asimétricas o simétricas. Cuando se analizaron las capas corticales de manera individual, también se encontró que el área media de las SAS establecidas sobre tallos dendríticos era siempre mayor que aquellas

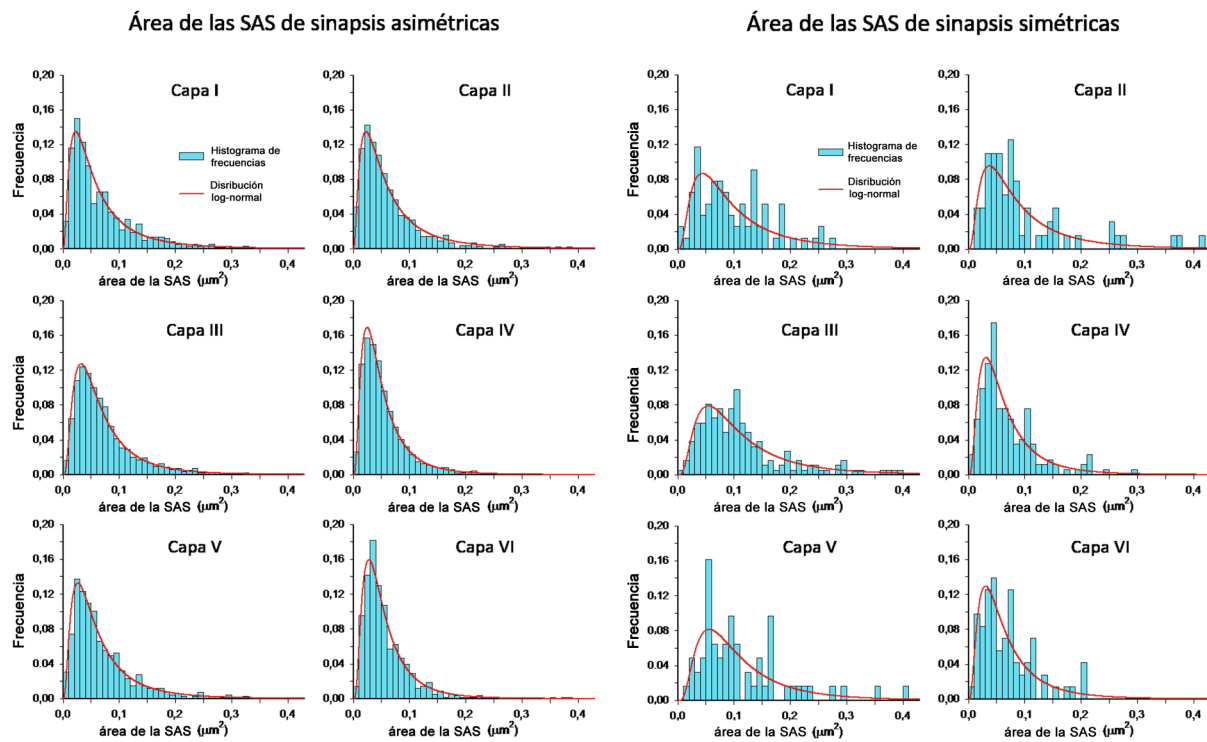


Figura 26. Áreas de las superficies de aposición sináptica y funciones de densidad de probabilidad en las seis capas corticales. Se han representado los histogramas de frecuencias (barras azules) del área de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las sinapsis asimétricas y simétricas, y las funciones de densidad de probabilidad teórica que mejor se ajustan (línea roja). En todos los casos la función que presentó un mejor ajuste fue una log-normal. Los parámetros μ y σ de las distribuciones log-normal se muestran en la Tabla 6.

Capa	SA					SS				
	Perímetro medio de las SAS \pm sem (nm)	n	μ	σ		Perímetro medio de las SAS \pm sem (nm)	n	μ	σ	
I	1538,03 \pm 42,13	594	7,16	0,60		2405,01 \pm 142,87	77	7,65	0,55	
II	1365,80 \pm 29,46	992	7,06	0,55		2141,62 \pm 130,11	64	7,55	0,52	
III	1638,51 \pm 19,64	2212	7,27	0,59		2838,22 \pm 118,19	185	7,81	0,54	
IV	1221,79 \pm 18,70	1200	6,99	0,47		1704,83 \pm 77,28	172	7,29	0,54	
V	1602,44 \pm 38,50	684	7,22	0,56		2736,41 \pm 186,46	62	7,77	0,50	
VI	1191,59 \pm 25,83	577	6,97	0,45		1697,00 \pm 112,65	72	7,29	0,55	
I-VI	1460,71 \pm 11,29	6259	7,14	0,54		2266,44 \pm 54,61	632	7,56	0,59	

Tabla 8. Parámetros de la distribución log-normal de los perímetros de las superficies de aposición sináptica (SAS). Perímetro medio de las superficies de aposición sinápticas (nm \pm sem), número de ellas analizadas (n), y localización (μ) y escala (σ) de las distribuciones log-normales que mejor se ajustan a la distribución de los datos experimentales en las seis capas corticales. También se muestra la media no ponderada de las seis capas. SA, sinapsis asimétricas; SS, sinapsis simétricas.

establecidas sobre espinas en todas las capas (Tabla 9). Pese a las diferencias en las áreas medias que se acaban de mencionar, los histogramas de frecuencias de las áreas para las sinapsis asimétricas y simétricas, tanto en tallos como en espinas, se solapan en gran medida, como se muestra en la Figura 27.

2.3 Forma de las uniones sinápticas

La forma de las uniones sinápticas es muy variable (Figura 28), pero puede ser categorizada en tres grupos. La mayoría de las sinapsis corticales presentaron una PSD de forma discoidal o macular (93%). Un pequeño porcentaje presentó perforaciones en la PSD (4,5%), y un porcentaje aún menor (2,5%) mostró un perímetro tortuoso, en forma de herradura. Las sinapsis maculares y perforadas mostraron la proporción de 9:1 entre sinapsis asimétricas y simétricas, pero en el caso de las PSDs en herradura, esta proporción fue 8:2, indicando que las sinapsis en herradura fueron relativamente más frecuentes entre las sinapsis simétricas que entre las asimétricas (χ^2 , $p < 0,001$).

El área media de las SAS de las sinapsis maculares fue más pequeña (media \pm sem; $61.737,72 \text{ nm}^2 \pm 606,10$) que el de las sinapsis en herradura ($148.469,66 \text{ nm}^2 \pm 6.321,63$; MW, $p < 0,001$), y el área de éstas resultó ser más pequeña que la de las perforadas ($176.710,07 \text{ nm}^2 \pm 5.875,00$; MW, $p = 0,01$) (Tabla 10). Pese a las diferencias en el área media de las SAS, las distribuciones de las sinapsis perforadas y en herradura se solapaban en gran medida con las de las maculares (Figura 28, Figura 29 y Tabla 11). El perímetro de las sinapsis maculares fue más pequeño ($1.423,96 \text{ nm} \pm 10,22$) que el de las sinapsis en herradura ($3.124,70 \text{ nm} \pm 107,62$; MW, $p < 0,001$) y el de las sinapsis perforadas ($3.106,10 \text{ nm} \pm 87,94$; MW,

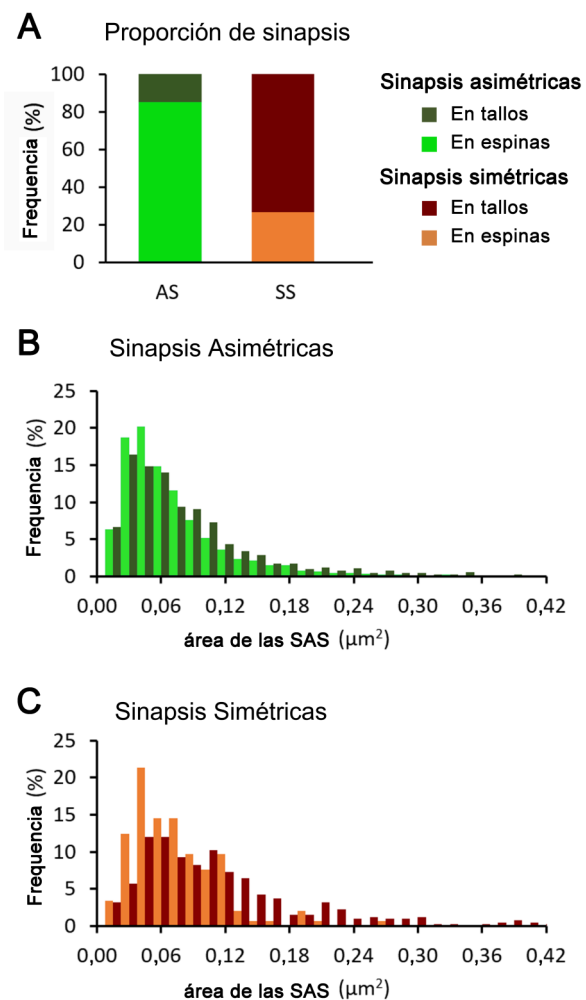


Figura 27. Área de las superficies de aposición sináptica (SAS) de las sinapsis en tallos y espinas dendríticas. (A) Proporciones de sinapsis asimétricas y simétricas en tallos y espinas dendríticas. (B) Histogramas de frecuencias de las áreas de las SAS de sinapsis asimétricas en espinas (verde claro) y en tallos dendríticos (verde oscuro). (C) Histogramas de frecuencias de las áreas de las SAS de sinapsis simétricas en espinas (naranja) y en tallos dendríticos (rojo). Las frecuencias en (B) y (C) han sido normalizadas para cada categoría.

		I	II	III	IV	V	VI
SA	Cabeza	70038,63± 64368,04	61971,49± 58425,41	72037,10± 55801,06	54188,34± 42249,21	70150,59± 58353,25	55648,73± 44776,53
	Cuello	103063,38± 10527,98	53852,41± 44454,46	49812,85± 35411,12	41208,40± 21993,39	39873,24± 25305,98	67045,54± 55130,77
	Tallo	80627,22± 6678,53	101221,57± 07565,68	82535,49± 65411,30	55984,94± 43261,63	82678,52± 62613,34	79990,50± 68931,78
	Total	72186,56± 65588,26	65311,03± 64969,21	73008,16± 57067,96	54156,00± 42060,60	71872,80± 59018,08	60743,90± 51524,59
SS	Cabeza	68036,63± 54252,39	70474,22± 38203,55	89635,26± 36198,99	53849,93± 30098,95	80338,44± 30859,41	52297,75± 31587,56
	Cuello	69898,72± 30127,63	104035,56± 90166,90	119487,75± 51082,26	38232,54± 18543,54	46303,32± 21050,11	67949,60± 28090,83
	Tallo	127444,73± 85018,96	111291,57± 99956,10	123539,08± 98341,62	83268,35± 61569,71	125797,54± 89305,41	80407,19± 56912,61
	Total	68036,63 ± 54252,39	105884,18± 93746,19	119761,84± 92751,64	70802,08± 53328,64	115572,79± 84611,46	72991,96± 51387,60
Todos (SA + SS)	Cabeza	69968,79± 63988,78	62034,70± 58289,84	72228,62± 55647,67	54168,87± 41633,86	70278,21± 58082,77	55536,45± 44372,19
	Cuello	83554,76± 73312,96	69534,64± 63738,58	58522,21± 43746,23	40577,15± 21068,90	41357,10± 23708,58	67303,84± 47817,15
	Tallo	97719,33± 77025,13	104691,06± 04690,54	96832,14± 80762,90	65396,66± 51868,32	94787,29± 73417,34	80110,88± 65476,99
	Total	76474,08± 68194,68	67550,74± 67453,68	76721,93± 61947,19	56217,61± 43932,18	75297,57± 62438,62	62021,17± 51598,67

Tabla 9. Área de las superficies de aposición sináptica (media ± sem) de las sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS) localizadas en la cabeza y en el cuello de las espinas, o en los tallos dendríticos, en las seis capas corticales (I-VI).

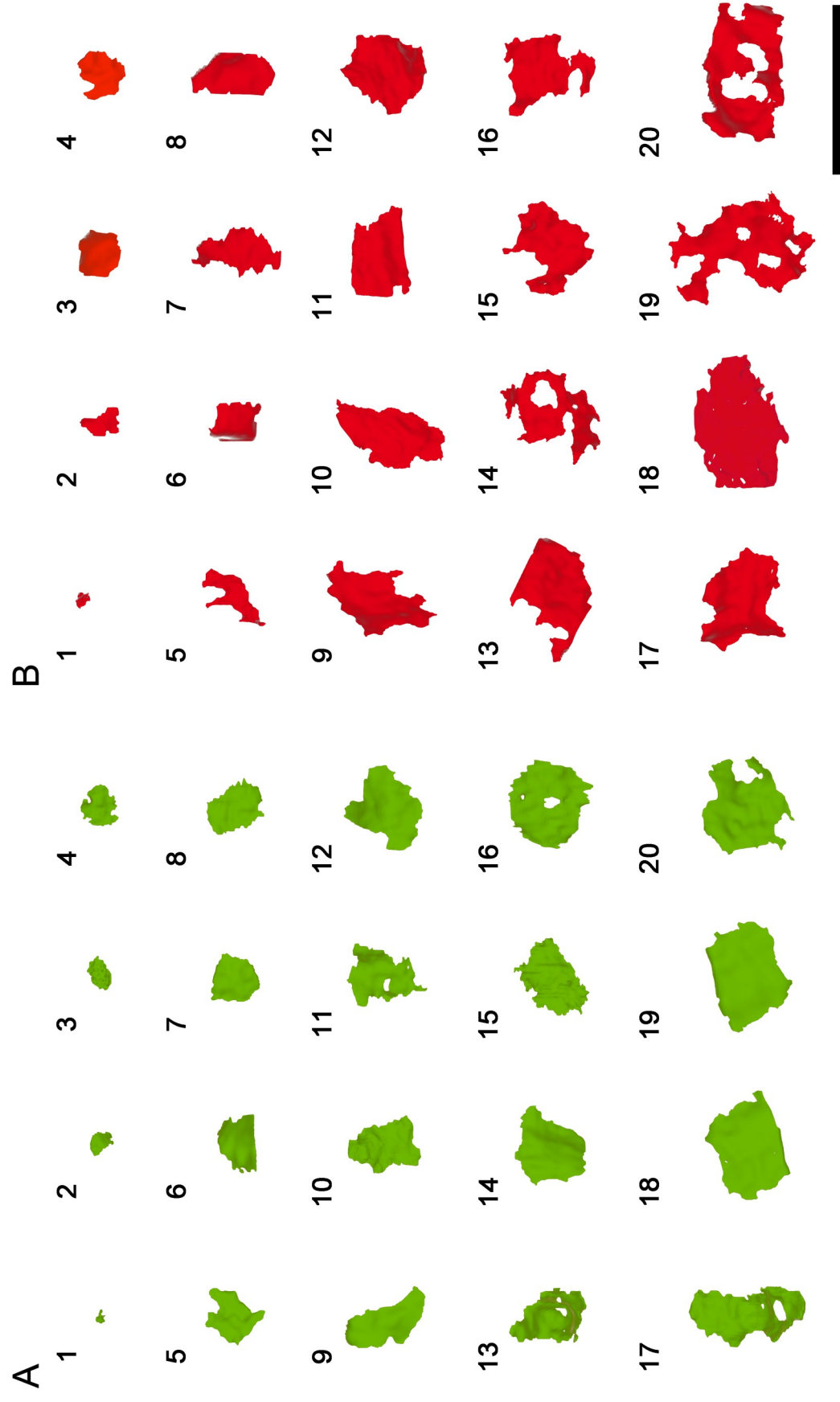


Figura 28. Muestra representativa de las superficies de aposición sináptica de sinapsis asimétricas y simétricas. (A) Las SAS de las sinapsis asimétricas (verde) se distribuyeron en 20 grupos iguales en orden creciente de tamaño. Se ha representado un ejemplo tomado de cada grupo. **(B)** Las SAS de sinapsis simétricas (rojo) se distribuyeron y seleccionaron igual que en (A). Barra de escala = 1 μ m.

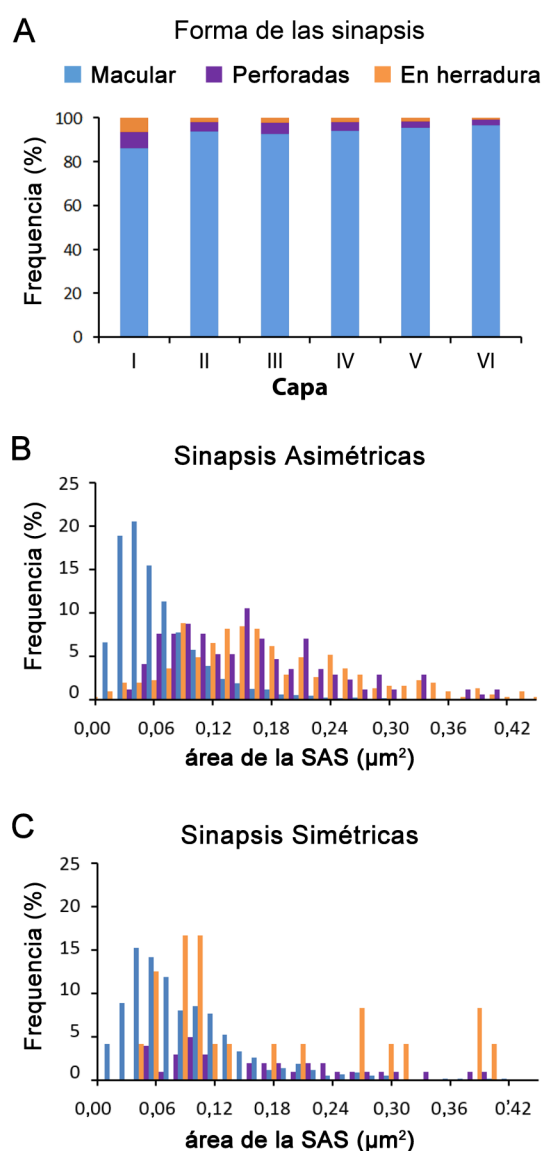


Figura 29. Distribución de sinapsis de distintas morfologías. (A) Proporción de sinapsis maculares (azul), perforadas (morado) y en herradura (naranja) en las seis capas de la corteza. La capa I muestra una mayor proporción de sinapsis perforadas y en herradura, comparado con el resto de las capas (χ^2 , $p < 0,001$). (B) Histograma de frecuencias del área de las SAS de sinapsis asimétricas maculares, perforadas y en herradura. (C) Histograma de frecuencias del área de las SAS de sinapsis simétricas maculares, perforadas y en herradura. Las frecuencias en (B) y (C) se han normalizado para cada categoría. Véase también la Tabla 11.

$p < 0,001$). Los perímetros de las sinapsis en herradura y perforadas no mostraron diferencias significativas (MW, $p = 0,59$) (Tabla 10).

En las tres categorías (macular, en herradura y perforadas), las sinapsis simétricas presentaron un tamaño y perímetro mayor que las asimétricas (Tabla 10), aunque estas diferencias fueron significativas únicamente en el caso de las sinapsis maculares (MW; $p < 0,001$).

Las proporciones de sinapsis maculares, en herradura y perforadas fueron similares en las capas II a VI. Por el contrario, encontramos que las sinapsis en herradura y perforadas fueron más comunes en la capa I (χ^2 , $p < 0,001$) (Figura 29 A). No encontramos ninguna preferencia en la localización de las sinapsis maculares, en herradura o perforadas en espinas o tallos dendríticos, siendo así tanto para las sinapsis asimétricas (χ^2 , $p = 0,22$) como para las simétricas (χ^2 , $p = 0,66$).

También se midió la curvatura de las SAS como 1 menos el cociente del área proyectada de la SAS entre el área de la SAS. Este valor es igual a 0 en una sinapsis completamente plana e incrementa su valor hasta 1 según la sinapsis aumenta su curvatura (véase el Capítulo III. Materiales y Métodos). Los resultados indican que la curvatura de las SAS fue mayor en las sinapsis simétricas que en las asimétricas en todas las capas (MW, $p \leq 0,03$) (Figura 30 A). La comparación por parejas de la curvatura de las sinapsis asimétricas entre capas mostró que había diferencias entre todas las capas (MW, $p < 0,05$) salvo entre las capas I y II (MW, $p = 0,33$) y las capas III y V (MW, $p = 0,14$). En el caso de las sinapsis simétricas, se encontraron diferencias entre las capas IV y VI (donde eran más planas) y todas las demás capas (MW, $p < 0,001$). Las sinapsis maculares eran más planas ($0,07 \pm 0,001$) que las sinapsis en herradura ($0,11 \pm 0,005$; MW, $p < 0,001$) y que

Forma de la unión sináptica	Tipo de sinapsis	Area (nm ²) media ± sem	Perimetro (nm) media ± sem	Curvatura media ± sem
Macular	SA	59271,15 ± 595,95	1353,95 ± 9,55	0,07 ± 0,001
	SS	86903,65 ± 2816,34	2138,30 ± 51,47	0,09 ± 0,003
	SA+SS	61737,72 ± 606,10	1423,96 ± 10,22	0,07 ± 0,001
Perforada	SA	175955,57 ± 5842,02	3056,56 ± 85,68	0,10 ± 0,004
	SS	185606,8 ± 30594,69	3690,38 ± 488,31	0,08 ± 0,010
	SA+SS	176710,07 ± 5875,00	3106,10 ± 87,94	0,10 ± 0,003
En herradura	SA	146689,44 ± 6756,57	3015,70 ± 109,07	0,11 ± 0,006
	SS	155387,11 ± 16435,88	3548,22 ± 304,55	0,08 ± 0,009
	SA+SS	148469,66 ± 6321,63	3124,70 ± 107,62	0,11 ± 0,005

Tabla 10. Área (nm²), perímetro (nm) y curvatura de las superficies de aposición sináptica de sinapsis maculares, perforadas y en herradura. SA, sinapsis asimétricas; SS, sinapsis simétricas. Todos los datos se dan como media ± sem.

	SA				SS			
	Área (nm ²) media ± sem	n	μ	σ	Área (nm ²) media ± sem	n	μ	σ
Macular	59271,15 ± 595,95	5836	10,73	0,79	86903,65 ± 2816,34	572	11,11	0,76
Perforada	175955,57 ± 5842,02	283	11,91	0,63	185606,83 ± 30594,69	24	11,84	0,76
En herradura	146689,44 ± 6756,82	136	11,75	0,57	155387,11 ± 16435,88	35	11,73	0,70
En herradura y perforadas	166456,30 ± 4559,20	419	11,86	0,62	167679,88 ± 15771,21	59	11,45	1,07

Tabla 11. Área media de las superficies de aposición sináptica y parámetros de las distribuciones log-normales que mejor se ajustan a la distribución de los datos de las sinapsis maculares, perforadas y en herradura. Área media (nm ± sem), número de SAS analizadas (n), y localización (μ) y escala (σ) de las distribuciones log-normales. SA, sinapsis asimétricas; SS, sinapsis simétricas.

las perforadas ($0,10 \pm 0,003$; MW, $p < 0,001$). Las sinapsis en herradura y perforadas presentaron curvaturas similares (MW, $p = 0,58$) (Tabla 10). No se encontró ninguna correlación entre el área y la curvatura de las SAS ($R^2 = 0,08$ para sinapsis asimétricas; $R^2 = 0,03$ para sinapsis simétricas) (Figura 30 B).

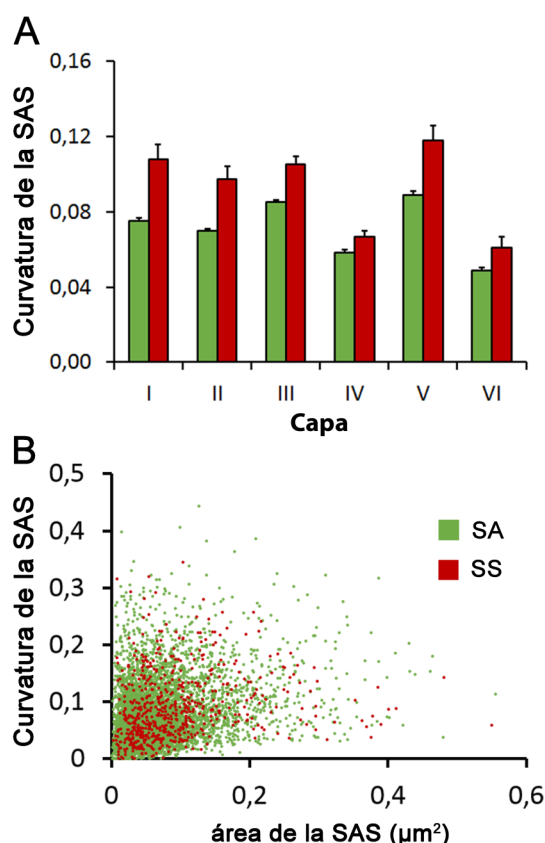


Figura 30. Curvatura de las superficies de aposición sináptica (SAS). (A) Curvatura de las SAS de sinapsis asimétricas (SA) y simétricas (SS) en las seis capas de corteza ($media \pm sem$). La curvatura fue mayor en el caso de las SS (barras rojas) que las SA (barras verdes) en todas las capas. (B) Gráfico de dispersión representando la relación entre la curvatura y el área de las SAS de las SA (verde) y SS (rojas), no se encontró ninguna correlación entre ambas variables ($R^2 = 0,08$ para SA; $R^2 = 0,03$ para SS).

3. Estudio de la distribución de mitocondrias en el neuropilo

3.1 Fracción de volumen mitocondrial

A continuación, el trabajo se centró en el estudio de la fracción de volumen de neuropilo ocupada por mitocondrias (Vm). Se encontró que la Vm varió entre capas, incrementándose desde la capa I hasta alcanzar el máximo en la capa IV (7,74%) y descendiendo hacia la capa VI donde alcanzó el mínimo (4,03%) (Figura 31, Tabla 12). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la capa IV y todas las demás capas, y entre la capa III y todas las demás capas salvo la V (MW, $p < 0,036$); para una comparación estadística detallada véase Tabla 13.

3.2 Distribución de mitocondrias en los compartimentos subcelulares

Una vez estimada la fracción de volumen mitocondrial en el neuropilo, se estudió la proporción de volumen mitocondrial localizada en axones, dendritas y elementos no sinápticos (Figura 31, Tabla 14). La mayor parte del volumen mitocondrial (58,58% de media) se localizó en dendritas y axones, mientras que el 41,42% se localizó en elementos no sinápticos. Considerando únicamente las mitocondrias localizadas en axones y dendritas, se encontró que las mitocondrias localizadas en dendritas (74,38%) predominaban sobre las localizadas en axones (25,62%) (Figura 31, Tabla 14). En la capa I se encontró la mayor predominancia de mitocondrias localizadas en dendritas frente a mitocondrias localizadas en los axones, y esta diferencia fue estadísticamente significativa

cuando se comparó la capa I con las demás capas (χ^2 , $p=0.03$).

Si sólo se considera el compartimento axónico, la fracción de volumen mitocondrial localizada en axones excitadores fue, de media 74,57%, seguida de mitocondrias localizadas en axones inhibidores (22,73%) y mitocondrias localizadas en axones mielínicos (2,70%). Las mitocondrias localizadas en axones mielínicos se encontraron únicamente en las capas V y VI (Figura 32, Tabla 14). Aunque parece que hay una tendencia a que aumente la proporción de mitocondrias

localizadas en axones inhibidores hacia capas infragranulares, estas diferencias entre capas no son estadísticamente significativas (KW, $p=0,06$).

Como ya se ha visto, la fracción de volumen mitocondrial localizada en dendritas fue mayor que la localizada en axones. Esto podría deberse no solo a que la fracción de volumen de dendritas es mayor que la de axones, sino a que las mitocondrias se acumulen preferentemente en dendritas. Para analizar si las mitocondrias se localizan preferentemente

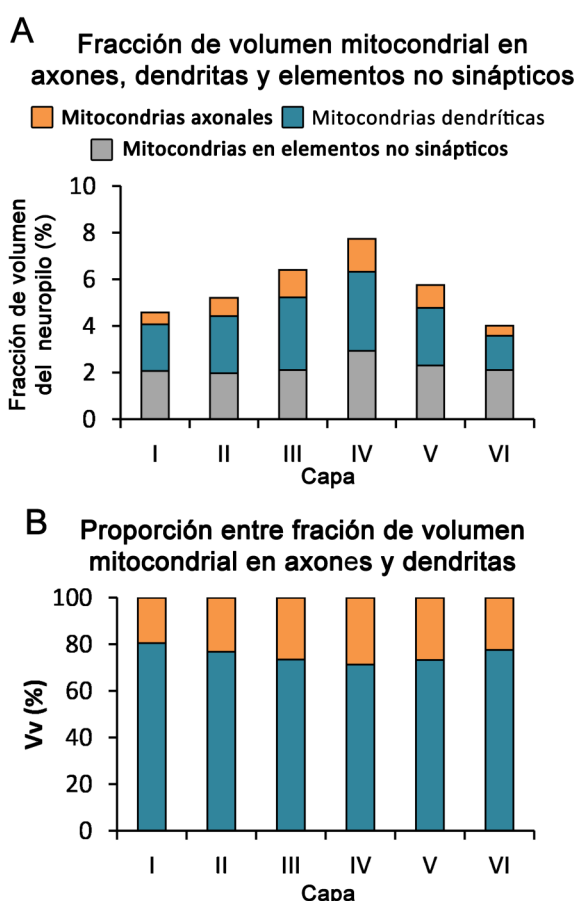


Figura 31. Fracción de volumen mitocondrial localizada en axones, dendritas y elementos no sinápticos del neuropilo. (A) Fracción de volumen mitocondrial localizada en axones (naranja), dendritas (turquesa), y elementos no sinápticos (gris) en las seis capas de la corteza. **(B)** Proporción entre la fracción de volumen mitocondrial localizada en elementos axónicos (naranja) y dendríticos (turquesa) en el neuropilo de las seis capas de la corteza. Véase también la Tabla 14.

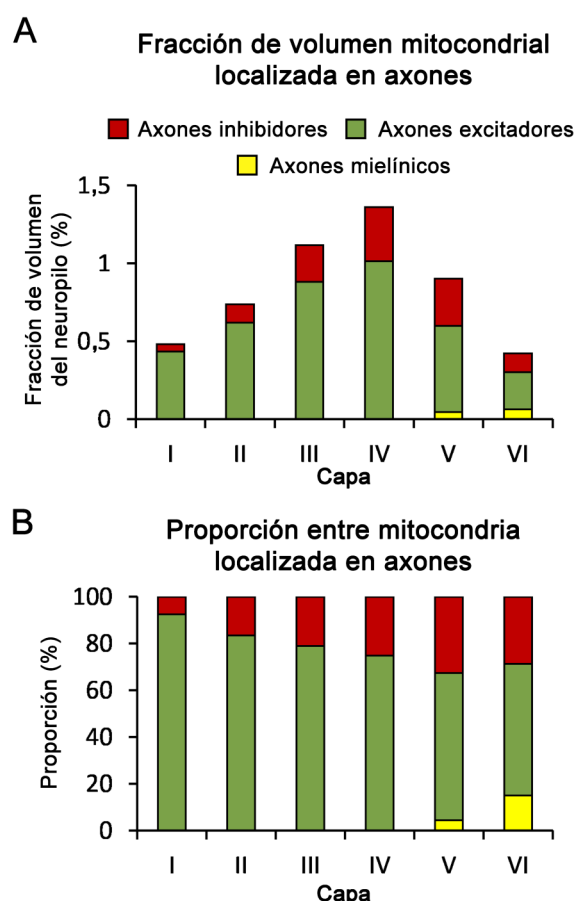


Figura 32. Fracción de volumen y proporción de mitocondrias localizadas en axones. (A) Fracción de volumen mitocondrial localizada en axones excitadores (verde), inhibidores (rojo) y mielinizados (amarillo) en las seis capas de la corteza. **(B)** Proporción entre fracción de volumen mitocondrial localizada en axones excitadores, inhibidores y mielinizados en el neuropilo de las seis capas de la corteza. Véase también la Tabla 14.

Capa	Nº imágenes	Media	sem	CV	CE
I	79	4,59	0,041	1,52	0,89
II	94	5,22	0,307	11,74	5,87
III	253	6,40	0,217	10,70	3,38
IV	122	7,74	0,372	11,13	4,98
V	92	5,75	0,485	14,67	8,47
VI	112	4,03	0,314	15,66	7,83

Tabla 12. Media de la fracción de volumen mitocondrial dada en porcentaje, sem, número de imágenes analizadas y coeficientes de variación (CV) y de error de muestreo (CE) en cada una de las seis capas de la corteza. El error de muestreo es mucho menor al 10%, lo que pone de manifiesto la fiabilidad de los datos.

I						
II	0,400					
III	0,007	0,014				
IV	0,036	0,016	0,019			
V	0,100	0,629	0,217	0,036		
VI	0,400	0,057	0,002	0,016	0,114	
	I	II	III	IV	V	VI

Tabla 13. Comparaciones pareadas de la fracción de volumen mitocondrial en las seis capas de la corteza. Test de Mann-Withney, se indican los valores de p obtenidos.

Capa	Fracción de volumen mitocondrial (% ± sem)	Porcentaje de volumen mitocondrial localizado en distintos				
		Dendritas	Axones (excitadores)	Axones (inhibidores)	Axones (mielinicos)	Elementos no sinápticos
I	4,59 ± 0,04	43,44 ± 3,01	10,21 ± 2,11	1,04 ± 0,57	0,00 ± 0,00	45,31 ± 5,42
II	5,22 ± 0,31	46,50 ± 3,79	12,92 ± 1,67	2,36 ± 0,72	0,00 ± 0,00	38,22 ± 3,15
III	6,40 ± 0,22	48,70 ± 2,71	14,35 ± 1,13	3,89 ± 0,59	0,00 ± 0,00	33,06 ± 3,04
IV	7,74 ± 0,39	43,92 ± 2,56	13,53 ± 0,76	4,59 ± 0,67	0,00 ± 0,00	37,96 ± 2,40
V	5,75 ± 0,49	42,67 ± 3,20	10,04 ± 2,76	5,43 ± 1,71	0,81 ± 54	41,05 ± 5,40
VI	4,03 ± 0,32	36,21 ± 0,94	6,11 ± 0,94	3,16 ± 0,58	1,62 ± 0,19	52,91 ± 2,51
I-VI	5,62 ± 0,54	43,57 ± 1,73	11,19 ± 1,25	3,41 ± 0,65	0,40 ± 0,28	41,42 ± 2,82

Tabla 14. Fracción de volumen mitocondrial localizada en distintos compartimentos. Media de la fracción de volumen mitocondrial localizada en dendritas, axones excitadores, axones inhibidores, axones mielinizados y elementos no sinápticos en las seis capas de la corteza. Todos los datos se dan como porcentajes. Véanse también las Figuras 33 y 34.

en alguno de los compartimentos subcelulares del neuropilo se calculó el cociente entre la fracción de volumen mitocondrial localizada en los tres compartimentos del neuropilo (dendritas, axones y elementos no sinápticos) (Tabla 14) y la fracción de volumen de dichos compartimentos, obtenidas en estudios previos de nuestro laboratorio (Tabla 15). Este cociente será igual a 1,00 si las mitocondrias no se localizan preferentemente en ninguno de los compartimentos y estará por encima o debajo de 1,00 si las mitocondrias prefieren o evitan, respectivamente, alguno de los compartimentos (Figura 33). Para las mitocondrias dendríticas el cociente fue de media 1,15, indicando que las mitocondrias son proporcionalmente más abundantes en dendritas, con excepción de la capa I, donde la proporción fue próxima a 1,00 (0,94). El cociente para las mitocondrias localizadas en elementos no sinápticos fue de media 1,08, aunque varió entre 0,88 y 1,34 en distintas capas. Para las mitocondrias localizadas en axones excitadores el cociente es menor que 1,00 en todas las capas (0,59 de media), lo que sugiere que las mitocondrias son proporcionalmente menos abundantes en axones excitadores que en dendritas. En el caso

de los axones inhibidores, se encontraron variaciones más dramáticas, ya que el cociente varió entre 0,33 en la capa I y valores mucho mayores en las capas infragranulares (hasta 1,95 en la capa V) (Figura 33).

3.3 Relación entre las mitocondrias y las sinapsis

La densidad de sinapsis de la corteza cerebral ha sido previamente descrita en esta tesis (véase el Epígrafe 1.3 Densidad de sinapsis asimétricas y simétricas en espinas y tallos dendríticos) y por lo tanto se puede correlacionar la densidad de sinapsis en cada serie de imágenes con su fracción de volumen mitocondrial (Figura 34). Se encontró una correlación positiva ($R^2=0,49$) entre la densidad sináptica y la fracción de volumen mitocondrial. Resulta interesante constatar que la correlación se mantiene entre la densidad sináptica y el volumen mitocondrial dendrítico ($R^2=0,46$), pero cae respecto al volumen mitocondrial axónico ($R^2=0,30$). Finalmente, no existe correlación entre la densidad sináptica y la fracción de volumen mitocondrial localizada en elementos no sinápticos ($R^2=0,03$).

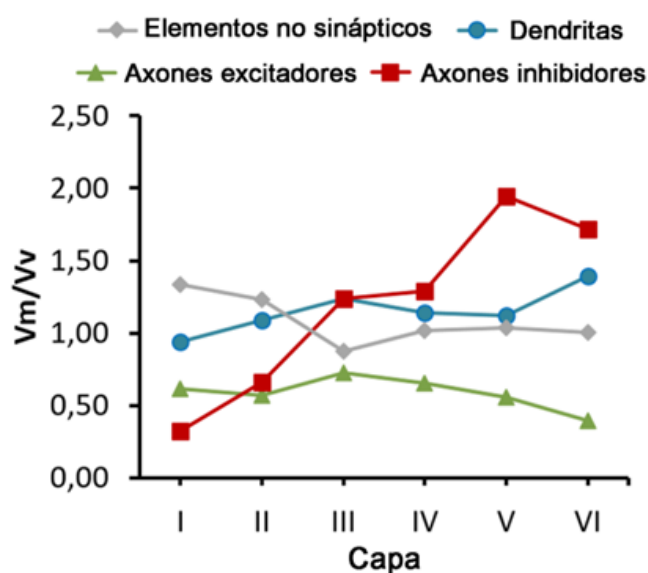


Figura 33. Relación entre la fracción de volumen de mitocondrias localizadas en distintos compartimentos celulares y las proporciones de esos compartimentos en el neuropilo. Las proporciones se han calculado para las seis capas corticales a partir de las Tablas 14 y 15. Un valor igual a 1,00 indica que la proporción de mitocondrias en un compartimento corresponde a la proporción de ese compartimento en el neuropilo. Valores mayores o menores a 1,00 indican que las mitocondrias son relativamente más o menos abundantes, respetivamente, en ese compartimento.

Fracción de volumen de dendritas, axones y elementos no sinápticos (% \pm sem)					
Capa	Dendritas	Axones (excitadores)	Axones (inhibidores)	Axones (mielinicos)	Elementos no sinápticos
I	46,31 \pm 2,53	16,56 \pm 0,34	3,20 \pm 0,16	0,00 \pm 0,00	33,93 \pm 2,03
II	42,72 \pm 0,02	22,64 \pm 1,83	3,55 \pm 0,69	0,00 \pm 0,00	31,09 \pm 2,54
III	39,35 \pm 0,19	19,72 \pm 0,55	3,15 \pm 0,20	0,00 \pm 0,00	37,78 \pm 1,14
IV	38,45 \pm 2,36	20,33 \pm 0,47	3,55 \pm 0,49	0,38 \pm 0,24	37,29 \pm 2,62
V	38,16 \pm 2,61	18,42 \pm 0,27	2,79 \pm 0,56	1,13 \pm 0,92	39,51 \pm 2,71
VI	26,03 \pm 2,43	14,98 \pm 0,64	1,84 \pm 0,77	4,63 \pm 0,65	52,52 \pm 3,20
I-VI	38,50 \pm 2,80	18,78 \pm 0,91	3,01 \pm 1,12	1,02 \pm 0,74	38,69 \pm 0,26

Tabla 15. Fracción de volumen de dendritas, axones y elementos no sinápticos en el neuropilo de las seis capas de la corteza. Todos los datos se dan como porcentajes. Datos obtenidos en el laboratorio.

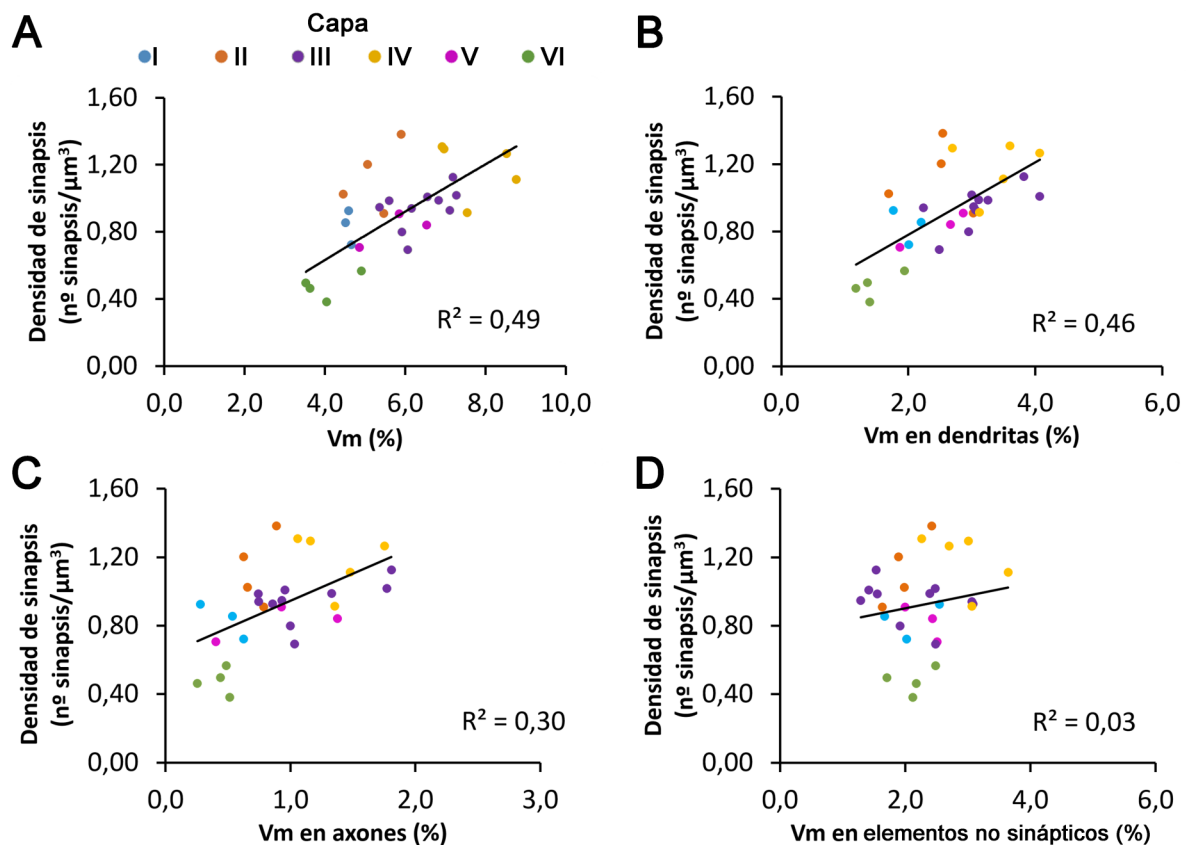


Figura 34. Correlación entre la densidad de sinapsis y la fracción de volumen mitocondrial en distintos compartimentos del neuropilo. Correlación entre la densidad de sinapsis y (A) la fracción de volumen mitocondrial (Vm), (B) la fracción de volumen mitocondrial localizada en dendritas, (C) la fracción de volumen mitocondrial localizada en axones y (D) la fracción de volumen mitocondrial localizada en elementos no sinápticos, en las seis capas corticales.

V. DISCUSIÓN

1. Estudio de la distribución de sinapsis en el neuropilo

En este estudio hemos obtenido estimaciones precisas de las proporciones de sinapsis asimétricas y simétricas y sus dianas dendríticas en el neuropilo de las seis capas de la corteza somatosensorial de la rata. Para ello hemos usado una muestra de más de 6.100 sinapsis que han sido segmentadas y visualizadas en tres dimensiones. Los principales resultados en este apartado son: (I) las sinapsis asimétricas superan numéricamente a las simétricas en una proporción aproximada de 9:1 y las sinapsis en espinas superan a las sinapsis en tallos dendríticos en una proporción aproximada de 8:2. (II) la mayoría de las sinapsis en el neuropilo son asimétricas en espinas (75,54%), seguidas de asimétricas en tallos dendríticos (14,73%), simétricas en tallos (7,08%) y por último simétricas en espinas (2,65%). (III) más del 90% de las sinapsis se establecen sobre dendritas espinosas. (IV) tanto las sinapsis asimétricas como las simétricas son más numerosas en la capa IV y menos numerosas en la capa VI, mientras que no se han encontrado diferencias entre las demás capas. (V) El porcentaje de espinas que establecen más de una sinapsis está por debajo del 6%.

1.1 Origen de las sinapsis del neuropilo cortical

El origen de la gran mayoría de axones excitadores en la corteza son las neuronas piramidales, y las espinas son la principal diana postsináptica de estos terminales (DeFelipe y Fariñas 1992). No obstante, parece haber subpoblaciones de células piramidales cuya arborización axónica local establece selectivamente más sinapsis en espinas o en tallos dendríticos. Por ejemplo, en la corteza

visual del gato, las neuronas piramidales de las capas II/III y V establecen sinapsis predominantemente en espinas, mientras que las de la capa VI que proyectan a la capa IV hacen sinapsis generalmente en el tallo dendrítico (Kisvarday *et al.* 1986, Somogyi *et al.* 1998). En nuestro estudio, hemos encontrado que la proporción de sinapsis asimétricas establecidas en espinas no varía significativamente entre las capas corticales, oscilando en torno al 80-90%, lo que concuerda con resultados previos obtenidos en la corteza visual de la rata (Larkman 1991). No obstante, tanto los axones colaterales locales de las células piramidales como los axones de neuronas piramidales localizadas en otras regiones (conexiones corticocorticales), contribuyen a la población sináptica. Puesto que el patrón de conexión corticocortical varía según la especie, el área cortical y la capa estudiada (véanse Felleman y Van Essen (1991), Markov *et al.* (2011) para una revisión del tema), y dado que nuestros datos ultraestructurales no ofrecen información sobre el origen de las sinapsis, son necesarios más estudios para examinar la proporción de sinapsis originadas desde axones de neuronas locales o distantes.

Otra fuente de sinapsis asimétricas son las aferencias talámicas, cuyas dianas principales son también las espinas (Rodríguez-Moreno *et al.* 2017). La mayoría de las células piramidales tienen una parte significativa de sus árboles dendríticos en las capas donde terminan los axones talamocorticales, pero hay una gran variabilidad en el número y la proporción de las sinapsis talámicas que establecen distintas neuronas piramidales. Por ejemplo, White and

Keller (1989) describieron que en la corteza somatosensorial del ratón, las neuronas piramidales que proyectan a áreas corticales ipsilaterales, al tálamo y al estriado, muestran en sus dendritas de la capa IV una proporción característica de sinapsis realizadas con axones talamocorticales: las células corticotalámicas reciben el mayor número de sinapsis talamocorticales ($13,21 \pm 5,06\%$ de todas las sinapsis axoespinosas), las células corticocorticales reciben menos de un tercio ($4,02 \pm 2,14\%$), y las corticoestriatales reciben el menor número de sinapsis talamocorticales ($0,55 \pm 0,15\%$). Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar las diferentes proporciones de sinapsis en espinas y tallos dendríticos en relación al origen local, cortical o subcortical de los axones en la corteza somatosensorial de la rata.

Respecto al origen de las sinapsis simétricas, la mayor fuente son los axones de interneuronas GABAérgicas, y distintos tipos de interneuronas GABAérgicas hacen sinapsis de forma preferente con regiones concretas de las neuronas piramidales o con interneuronas (Ascoli *et al.* 2008, DeFelipe y Fariñas 1992, Freund y Buzsáki 1996, Houser *et al.* 1984, Jones 1993, Somogyi *et al.* 1998). Así, no todas las interneuronas contribuyen de la misma manera a las sinapsis simétricas encontradas en el neuropilo. Muchos tipos de interneuronas, entre ellas las de Martinotti, las células en cesto y las *double bouquet* hacen sinapsis con espinas de células piramidales (DeFelipe *et al.* 1990, DeFelipe *et al.* 1989, Kawaguchi y Kubota 1998, Kisvarday *et al.* 1985, Somogyi y Cowey 1981, Wang *et al.* 2004). Por lo tanto, pese a que la proporción de sinapsis simétricas en espinas es relativamente baja, representan un componente importante de los circuitos sinápticos GABAérgicos (Kubota *et al.* 2015). Por último, es probable que las espinas que establecen sinapsis simétricas estén localizadas estratégicamente en el árbol dendrítico de las

neuronas piramidales. Por ejemplo, Kubota *et al.* (2007) encontraron que una gran proporción de axones que formaban sinapsis simétricas lo hicieron en espinas que también estaban innervadas por axones talamocorticales. Además las células *double bouquet* no parecen formar sinapsis axoespinosas con dendritas apicales, sino con dendritas basales y ramas oblicuas de dendritas apicales (DeFelipe *et al.* 1990, DeFelipe *et al.* 1989, Somogyi y Cowey 1981), mientras que ciertos tipos de células en cesto forman numerosas sinapsis con dendritas apicales (Kisvarday *et al.* 1987, Somogyi *et al.* 1983).

1.2 Proporción y densidad de sinapsis asimétricas y simétricas

La proporción de sinapsis asimétricas y simétricas que encontramos en el neuropilo de la corteza somatosensorial de la rata es similar a la descrita en estudios previos en otras especies y áreas corticales mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión, en los que se describió una variación de entre el 80% y el 95% para las sinapsis asimétricas y 5% y 20% para las simétricas (Beaulieu y Colonnier 1985, Braitenberg y Schüz 1998, DeFelipe 2011, DeFelipe y Fariñas 1992, Micheva y Beaulieu 1996, Schüz y Palm 1989). No hemos encontrado ninguna diferencia estadísticamente significativa en la proporción de sinapsis asimétricas y simétricas en las diferentes capas corticales, o entre capas supra e infragranulares. En nuestras muestras, la mayor proporción de sinapsis simétricas se encontró en la capa IV, lo que concuerda con los datos descritos por Micheva and Beaulieu (1996), quienes describieron que, desde el día P15 en adelante, la capa IV de la corteza de barriles de la rata tiene mayor porcentaje de sinapsis simétricas que el resto de las capas. Sin embargo, las diferencias que hemos

encontrado en la corteza somatosensorial son pequeñas entre las capas IV, I y VI, y no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la proporción de sinapsis excitadoras e inhibitoras se mantiene aproximadamente constante en todas las capas y áreas corticales. La significación funcional de la mencionada organización sináptica aún debe ser esclarecida.

La densidad de las sinapsis varía entre capas, siendo las capas II y IV las que mayor densidad presentan. Es interesante remarcar que éstas son también las capas con mayor densidad neuronal (Figura 35 A) (Markram *et al.* 2015). Sin embargo, en la capa I, la densidad de sinapsis es relativamente alta, pero la densidad de neuronas es muy baja, mientras que en la capa VI, la densidad de sinapsis es la más baja pero la densidad neuronal es mayor que en capas I, II y V. Por lo tanto, no parece que haya relación entre la densidad de neuronas y la densidad de sinapsis.

1.3 Dianas postsinápticas

Las proporciones de las dianas postsinápticas en el neuropilo se han descrito previamente en la corteza visual del gato adulto (Beaulieu y Colonnier 1985). Éste estudio mostró que, de todas las sinapsis, el 66,4% fueron asimétricas localizadas en espinas, el 17,6% fueron asimétricas localizadas en tallos dendríticos, el 10,6% fueron simétricas en tallos y el 5,3% fueron simétricas en espinas. Un estudio sobre la distribución de sinapsis en la corteza de barriles de la rata mostró que, a la edad de P15, las sinapsis asimétricas se localizan mayoritariamente en espinas (82%), seguido de tallos dendríticos (17%), encontrándose menos del 1% de en somas (Micheva y Beaulieu 1996). Respecto a las sinapsis simétricas, se localizan en tallos (54%), seguido de espinas (39%), con sólo un 8% localizado en el soma. También

describieron que, a esta edad, el 14% de las sinapsis son simétricas. En el presente estudio hemos encontrado que en el neuropilo de la rata P14 el 75,85% de las sinapsis son asimétricas en espinas, el 14,74% son asimétricas en tallos dendríticos, el 7,08% son simétricas en tallos y el 2,65% son simétricas en espinas. Por lo tanto, las sinapsis asimétricas en espinas predominan en todos los casos, seguidas de asimétricas en tallos dendríticos, simétricas en tallos y simétricas en espinas. Los distintos porcentajes obtenidos en los distintos estudios pueden deberse a que se han realizado en distintas especies, áreas corticales y edades (DeFelipe 2011, DeFelipe *et al.* 1999). Queda claro que las dianas preferidas por las sinapsis asimétricas son las espinas, y que las dianas preferidas por las simétricas son los tallos dendríticos (Figura 35 B). Además, nuestro análisis estadístico indica que la proporción de sinapsis simétricas en tallos dendríticos es entre 2,70 y 5,75 veces mayor que la proporción que se esperaría encontrar si estuviesen distribuidas al azar entre espinas y tallos, mientras que la proporción de sinapsis asimétricas axoespinosas sólo fue entre 1,05 y 1,08 veces más alto de lo que se esperaría por azar (véanse Tablas 2 y 3 del Capítulo IV. Resultados). Este tipo de análisis está basado en tablas de contingencia de 2x2 mostrando el número de sinapsis asimétricas y simétricas y las dianas postsinápticas (espinas y tallos), y como tal, no hace ninguna asunción sobre los posibles mecanismos implicados en tal distribución. Por ello, las razones biológicas de tal distribución deberán ser objeto de futuras investigaciones.

1.4 Número de sinapsis por espina

En general, se asume que cada espina establece una sinapsis, sin embargo, algunas espinas pueden tener múltiples sinapsis (Jones y Powell 1969, Popov *et al.* 2005). Recientemente se ha propuesto que hay una relación entre la memoria de larga duración y la

formación de múltiples sinapsis por espina, cuando el reforzamiento funcional de las sinapsis existentes está dañado (Giese *et al.* 2015, Radwanska *et al.* 2011). Aquí hemos encontrado que alrededor del 6% de las espinas tienen 2 o más sinapsis, un porcentaje mayor al descrito en trabajos previos en el hipocampo y la neocorteza, que lo situaban en torno al 1% (Bosch *et al.* 2015, Petrak *et al.* 2005, Radwanska *et al.* 2011).

También, hemos observado que la proporción de sinapsis múltiples en la misma espina no varía entre capas. Como ya se ha mencionado, cuando las espinas establecen solo una sinapsis, ésta es excitadora en más del 98% de los casos, mientras que las sinapsis inhibitoras son muy raras. Sin embargo, cuando las espinas forman múltiples sinapsis, la proporción entre sinapsis asimétricas y simétricas es aproximadamente 8:2. Por lo tanto, las sinapsis inhibitoras en espinas ocurren más frecuentemente cuando se establecen múltiples sinapsis. Las sinapsis en el cuello de la espina ocurren también más frecuentemente cuando hay varias sinapsis sobre la misma espina. Esto podría deberse a la falta de espacio en la cabeza de la espina para formar múltiples sinapsis, pero puede haber otros factores moleculares y funcionales implicados, dado que las proporciones de sinapsis simétricas y asimétricas en el cuello son diferentes. De hecho, la proporción de sinapsis simétricas y asimétricas en el cuello de la espina es en torno a 25 y 10 veces más alta, respectivamente, en espinas con múltiples sinapsis cuando se compara con espinas con una única sinapsis.

En el presente estudio no hemos analizado las espinas carentes de sinapsis, ya que hemos identificado primero las uniones sinápticas y después hemos identificado la diana postsináptica. Por ello ninguna estructura carente de conexiones sinápticas ha sido incluida en nuestro análisis. Estudios previos en

la neocorteza del ratón adulto han mostrado que la proporción de espinas sin sinapsis está por debajo del 4% (Arellano *et al.* 2007b), en el hipocampo de ratones de 8 semanas de edad no supera el 2% (Bosch *et al.* 2015) y en ratas adultas apenas alcanza el 0,2% (Petrak *et al.* 2005), pero son necesarios más estudios para determinar si esta proporción tan baja es similar en la corteza somatosensorial de la rata.

1.5 Sinapsis en dendritas con y sin espinas

Como ya se ha mencionado, la mayoría de las sinapsis se establecen en el neuropilo (Alonso-Nanclares *et al.* 2004), que se compone de axones, dendritas y prolongaciones gliales. Las prolongaciones dendríticas del neuropilo pueden tener espinas o no. En todas las capas el origen de las espinas dendríticas son las neuronas piramidales. La capa IV incluye además otras dos poblaciones de células con espinas: pirámides estrelladas y neuronas estrelladas. Aunque las dendritas de algunas interneuronas GABAérgicas presentan algunas espinas, sólo hay una pequeña población de éstas en el neuropilo (Kawaguchi *et al.* 2006). Por todo ello, y dado que las células piramidales son el tipo neuronal más abundante en la corteza (se estima que representan entre el 70% y el 80% de la población neuronal total), se puede asumir que las dendritas con espinas son el tipo de dendrita más común en el neuropilo. Esto se ha confirmado recientemente en el estudio de Kasthuri *et al.* (2015), donde reconstruyeron un cubo de $1.500\ \mu\text{m}^3$ de tejido cortical y encontraron que el 92% de las dendritas tenían espinas. En general, las dendritas sin espinas proceden de interneuronas GABAérgicas, no obstante, la porción proximal de las dendritas basales y apicales de las neuronas piramidales tampoco contiene espinas (revisado en DeFelipe 2015b). Pese a que en el presente estudio el muestreo

del neuropilo se realizó relativamente lejos de los somas de las neuronas piramidales —en este estudio no se utilizaron bloques de imágenes que contuvieran vasos sanguíneos, cuerpos celulares o tallos dendríticos en la cercanía de los somas—, no podemos descartar la posibilidad de que algunas dendritas libres de espinas correspondan a dendritas proximales de neuronas piramidales.

De nuestro trabajo se deduce que la mayoría de las sinapsis se establecen sobre neuronas con

espinas, no solo porque la gran mayoría de ellas (78,20%) se establecen sobre espinas, sino porque las sinapsis establecidas en los tallos de dendritas con espinas (12,86% del total de sinapsis) son más frecuentes que las establecidas sobre segmentos dendríticos sin espinas (8,94% del total de sinapsis). Por lo tanto, podemos concluir que el porcentaje de sinapsis en dendritas con espinas es, al menos, del 91,06%.

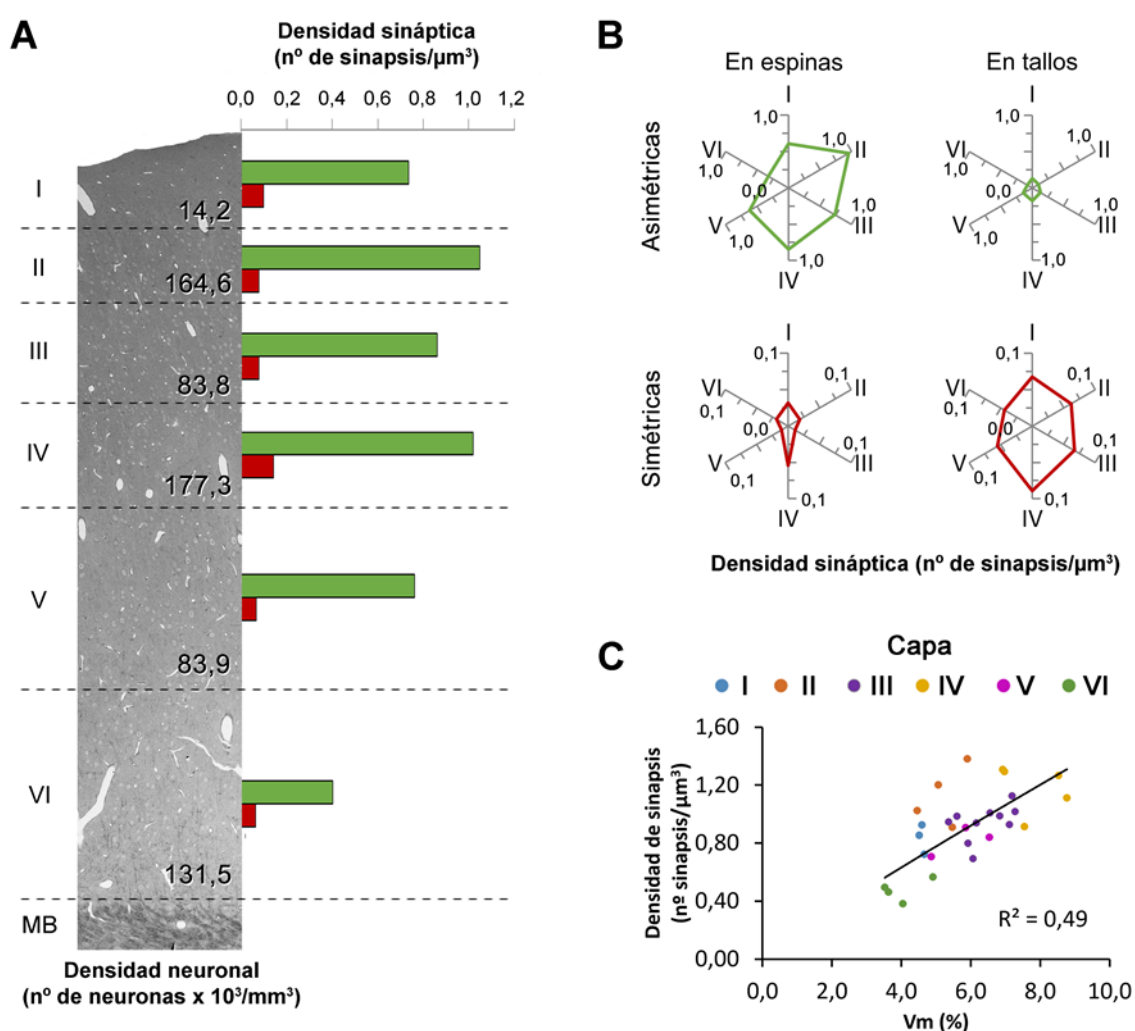


Figura 35. Resumen esquemático de los resultados. (A) Densidad neuronal y sináptica en las seis capas de la corteza somatosensorial de la rata. La imagen de la corteza cerebral se obtuvo con el detector de electrones secundarios del microscopio electrónico de barrido. Las densidades sinápticas de las sinapsis asimétricas se representan como barras verdes y las simétricas como barras rojas. MB = Sustancia blanca. La densidad neuronal se ha obtenido de Markram *et al* (2015). (B) Densidades sinápticas de sinapsis asimétricas (verde) y simétricas (rojo) en espinas y tallos dendríticos de las seis capas de la corteza. (C) Correlación entre la densidad de sinapsis y la fracción de volumen mitocondrial (Vm).

2. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis en el neuropilo

En este estudio hemos usado un nuevo método para estimar el tamaño y la forma de las sinapsis. Este método implica la extracción de la superficie de aposición sináptica (SAS) de uniones sinápticas que han sido previamente segmentadas en tres dimensiones. El estudio presenta tres aportaciones principales: (I) la media de las áreas de las SAS es más pequeña para las sinapsis asimétricas que las simétricas en todas las capas corticales, y estas diferencias son estadísticamente significativas en todos los casos. Tanto para sinapsis asimétricas como simétricas, de media las SAS más grandes se encontraron en la capa III y las más pequeñas en la capa IV. En todos los casos (la suma de sinapsis asimétricas y simétricas en todas las capas), la distribución de los tamaños de la unión sináptica formó una curva sesgada con una cola alargada hacia la derecha, que se corresponde con una distribución log-normal. (II) la mayoría de las sinapsis corticales tienen una densidad postsináptica (PSD) de forma discoidal o macular (93%). Un pequeño porcentaje presenta perforaciones en la PSD (4,5%), y un porcentaje aún menor (2,5%) muestra un perímetro tortuoso, en forma de herradura. (III) la curvatura de las SAS es mayor para las sinapsis simétricas que para las asimétricas en todas las capas. No se ha encontrado ninguna correlación entre el área y la curvatura de las SAS.

2.1 Métodos para estimar el tamaño de las uniones sinápticas

Tradicionalmente la estimación del tamaño de las uniones sinápticas se ha realizado usando gran variedad de métodos. El más simple y común es medir la longitud de la sección

transversal de las uniones sinápticas en micrografías de microscopía electrónica de transmisión. Este método tiene limitaciones obvias ya que se basa en el análisis de imágenes bidimensionales individuales, donde parte de las sinapsis no pueden ser completamente caracterizadas (por ejemplo, véase DeFelipe *et al.* 1999). Además, este método reduce la estimación del tamaño a una medida unidimensional que no es equivalente a ninguna medida geométrica fácilmente interpretable, como puede ser el diámetro medio.

Los métodos que usan secciones seriadas proporcionan resultados más fiables, incluso si utilizan sólo medidas simples como el ancho máximo de la PSD (Tarusawa *et al.* 2009). La longitud de la sección transversal de la PSD también se puede medir en cada sección de la serie y multiplicar por el grosor y número de secciones (Arellano *et al.* 2007a, Bopp *et al.* 2017, Hsu *et al.* 2017). Alternativamente, la PSD se puede reconstruir a partir de series de secciones, y su contorno se puede medir en tres dimensiones (Bosch *et al.* 2015, Bosch *et al.* 2016, Dufour *et al.* 2016, Rodríguez-Moreno *et al.* 2017, Rollenhagen *et al.* 2015). Otra medida que ha sido utilizada para estimar el tamaño de las uniones sinápticas en tres dimensiones es el diámetro de Feret, que es el diámetro de la esfera más pequeña que circunscribe el objeto reconstruido (Merchan-Perez *et al.* 2014). Se trata de una medida simple y fiable que puede ser obtenida automáticamente con un bajo coste computacional, y cuya utilidad en la construcción de modelos que reproducen la distribución de sinapsis en tres dimensiones ha quedado probada (Anton-Sanchez *et al.* 2014). Sin embargo, esta medida no proporciona información sobre la morfología de las sinapsis, puesto que simplifica las características geométricas del objeto, de modo que segmentaciones con morfologías muy diferentes pueden tener un diámetro de Feret

similar. Otra medida indirecta del tamaño de las sinapsis es la interfaz entre el botón axónico y la espina dendrítica (de Vivo *et al.* 2017). Esta metodología es también problemática ya que, pese a que el área de la interfaz axón-espina y el área de la PSD están correlacionados (Cheetham *et al.* 2014), dicha interfaz no proporciona ninguna información sobre la forma de la PSD. Por estos motivos, en el presente estudio hemos utilizado un nuevo método que se discute a continuación.

2.2 La superficie de aposición sináptica

En este trabajo hemos usado la superficie de aposición sináptica (SAS) porque tiene tres ventajas notables frente a los métodos descritos arriba (Morales *et al.* 2013): primero, se extrae de manera automática de las uniones sinápticas segmentadas previamente en tres dimensiones, de forma que se evita el trazado de contornos por parte del usuario y los posibles sesgos derivados de ello (Alonso-Nanclares *et al.* 2013, Morales *et al.* 2013). Segundo, pese a ser una superficie, la SAS también es un objeto tridimensional que reproduce la forma y la curvatura de la PSD. Por tanto, la SAS se puede visualizar en tres dimensiones para obtener información cualitativa como la presencia de perforaciones o hendiduras (véase la Figura 23, en el Capítulo IV. Resultados). Tercero, se puede obtener información cuantitativa del área, perímetro y curvatura de la SAS de manera que la forma y el tamaño se pueden correlacionar fácilmente. Dado que la segmentación inicial de las uniones sinápticas se ha realizado en muestras tridimensionales de tejido, usando un método semiautomático (Morales *et al.* 2011), y que las SAS se han extraído de forma completamente automática, hemos obtenido 6.891 uniones sinápticas cuya forma y tamaño han sido analizados en las seis capas corticales. Además,

hemos podido identificar sin ambigüedad la diana postsináptica (espinas o tallos dendríticos) en 6.000 de esas uniones sinápticas.

2.3 Tamaño de las uniones sinápticas

El tamaño de ambos tipos de sinapsis (asimétricas y simétricas) se ajusta a una distribución log-normal. Pese a que el área media de las SAS es más grande para las sinapsis simétricas que para las asimétricas, sus distribuciones solapan en gran medida (véase la Figura 25, en el Capítulo IV. Resultados), de manera que es imposible distinguir una sinapsis asimétrica de una simétrica basándose únicamente en su tamaño. Es interesante tratar de correlacionar la distribución log-normal de los tamaños sinápticos con otros parámetros como la fuerza sináptica o la probabilidad de la transmisión sináptica, que también se ajustan a distribuciones log-normales (revisado en Buzsaki and Mizuseki 2014). Por ejemplo, la distribución de la amplitud de los potenciales postsinápticos excitadores unitarios (EPSPs por sus siglas en inglés, *excitatory postsynaptic potentials*), es muy similar a la distribución del tamaño de las SAS descrito aquí, con una envolvente sesgada y una larga cola hacia la derecha (Lefort *et al.* 2009, Song *et al.* 2005). Además, la amplitud de los EPSPs se correlaciona fuertemente con el número de receptores de AMPA postsinápticos y con el volumen de la cabeza de la espina (Araya 2014, Kasai *et al.* 2003, Matsuzaki *et al.* 2001), lo que a su vez se correlaciona con el tamaño de la PSD (Arellano *et al.* 2007a). Experimentos de modelización sugieren que el tamaño de la PSD tiene una gran influencia en el número de receptores postsinápticos que se activan tras la liberación del neurotransmisor (Montes *et al.* 2015). También es interesante remarcar que la variabilidad de la respuesta sináptica en sinapsis individuales es mayor en las sinapsis más débiles y decrece en las más fuertes (Ikegaya *et al.* 2013, Lefort *et al.* 2009), lo que

podría estar relacionado con el tamaño de la unión sináptica, puesto que el mismo fenómeno (un descenso en la variabilidad con el aumento del tamaño sináptico) ha sido reproducido en experimentos de modelización (Franks *et al.* 2002, Montes *et al.* 2015). Todo esto sugiere que las sinapsis grandes tienen mayor número de receptores, son más fuertes, y tienen respuestas más fiables y homogéneas. No obstante, es importante mencionar que la amplitud de los EPSPs depende también de la geometría de las dendritas postsinápticas (Eyal *et al.* 2014, Major *et al.* 2013), así como de la morfología de las espinas dendríticas (Araya 2014, Gullledge *et al.* 2012). Otra importante fuente de variabilidad es el número de receptores postsinápticos en las sinapsis individuales. Por ejemplo, se ha demostrado en el hipocampo que la relación entre el número de receptores de AMPA y el tamaño sináptico tiene distintas pendientes en las sinapsis entre las colaterales de Shaffer y las espinas dendríticas de CA1, y en las sinapsis entre las fibras musgosas y las espinas de CA3 (Nusser *et al.* 1998). En la corteza somatosensorial de la rata, la concentración de receptores de AMPA es similar en sinapsis de distinto tamaño, de modo que las sinapsis más grandes tienen más receptores de AMPA (Kharazia y Weinberg 1999), mientras que los receptores de NMDA se encuentran más concentrados en sinapsis más pequeñas. En cualquier caso, es obvio que la distribución de distintos tipos de receptores en diferentes tipos de sinapsis es un asunto complejo (Hadzic *et al.* 2017), y la relación entre el tamaño sináptico y el número de receptores necesita ser estudiada en futuros trabajos de investigación.

Diferentes tamaños sinápticos han sido asociados también a diferentes funciones. Por ejemplo, se ha propuesto que las espinas dendríticas pequeñas son sitios preferentes para la inducción de la potenciación a largo plazo, mientras que las espinas grandes serían

el sustrato de la memoria a largo plazo (Kasai *et al.* 2010a, Matsuzaki *et al.* 2004). Nuestros datos muestran que el tamaño sináptico sigue una distribución log-normal, que es continua y unimodal, de forma que ni las sinapsis asimétricas ni las simétricas se pueden dividir en dos grupos basándose en el tamaño de la unión sináptica. Por lo tanto, si la función de “aprendizaje” o “memoria” depende del tamaño de la sinapsis, no habría una distinción clara entre los dos grupos. Por otro lado, se ha propuesto que el papel funcional de las sinapsis podría depender también de la disminución abrupta de la variabilidad entre eventos sinápticos a medida que aumenta el tamaño de la sinapsis, de modo que la transición funcional entre sinapsis de “aprendizaje” y “memoria” sería más rápida que si dependiese únicamente del tamaño de la sinapsis (Montes *et al.* 2015). En cualquier caso, si las sinapsis de distintos tamaños tienen distintas funciones, las sinapsis en los tallos dendríticos también deben ser consideradas. Pese a que estas sinapsis no son el tipo predominante (en torno al 15% de las asimétricas y el 73% de las simétricas), su tamaño medio es más grande que el de las sinapsis sobre espinas, tanto para sinapsis asimétricas como para simétricas, por lo que funcionalmente estarían más relacionadas con la memoria a largo plazo que con el aprendizaje.

2.4 Sinapsis en herradura y perforadas

Las uniones sinápticas con hendiduras (sinapsis en herradura) y perforadas son escasas en nuestras muestras, ya que en conjunto no superan el 7% del total de sinapsis. La cuestión es si éstas son una población separada de sinapsis, con diferentes características morfo-funcionales que las sinapsis maculares. Las sinapsis en herradura y perforadas se encuentran principalmente localizadas en la cola derecha de la distribución de sinapsis según su tamaño, de modo que su área media

es mayor que el área media de las sinapsis maculares, de acuerdo con numerosos estudios (Calverley y Jones 1987, Geinisman *et al.* 1987, Harris *et al.* 1992, Jones y Calverley 1991). No obstante, la distribución de tamaños se solapa en gran medida con la de la sinapsis maculares, de modo que no hay una clara frontera que separe ambos tipos (véase la Figura 29, en el Capítulo IV. Resultados). Respecto a la forma de las sinapsis en herradura y perforadas, estas son muy similares (salvo por la presencia de perforaciones), puesto que el perímetro tiende a ser más complejo a medida que la PSD aumenta su tamaño.

Si interpretáramos las hendiduras y perforaciones como características dinámicas que dependen del reciclaje molecular de los constituyentes de la PSD, entonces las PSDs perforadas y en herradura pertenecerían a la misma vía que las PSDs maculares. Las sinapsis más pequeñas tendrían formas maculares cuyo perímetro incrementaría su tortuosidad progresivamente al crecer la sinapsis, de modo que las hendiduras y perforaciones aparecerían (y desaparecerían) a medida que la PSD creciese. La incorporación de receptores a la PSD depende de la difusión lateral desde la membrana plasmática circundante (Choquet y Triller 2013, Li y Blanpied 2016) y de procesos de endocitosis y exocitosis desde los compartimentos endosomales (Choquet y Triller 2013, Kneussel y Hausrat 2016). En este escenario podemos hipotetizar que las hendiduras y perforaciones podrían ser los correlatos morfológicos de un reciclaje más activo (o más aparente) de los receptores y otras moléculas asociadas en las PSDs más grandes. De hecho, se ha demostrado en el hipocampo que las proporciones relativas de sinapsis en herradura, perforadas y fragmentadas (sinapsis con varias PSDs pequeñas, de forma irregular, no interconectadas) cambian después de la inducción de la potenciación a largo plazo

(Geinisman *et al.* 1993, Toni *et al.* 2001). Este fenómeno podría o no suceder en la neocorteza, donde hemos encontrado sinapsis en herradura y perforadas, pero no fraccionadas. El hecho de que tipos muy distintos de sinapsis, como las asimétricas y las simétricas tengan perforaciones y hendiduras sugiere también que estas características son el resultado de un mecanismo general e inespecífico relacionado con el crecimiento y remodelado sináptico.

Alternativamente, las sinapsis perforadas, y probablemente las sinapsis en herradura, podrían pertenecer a diferentes poblaciones de sinapsis. El principal argumento que apoya esta hipótesis es que, en algunos terminales, específicamente en los botones talamocorticales de la capa IV, las sinapsis perforadas son frecuentes (Bopp *et al.* 2017, Rodríguez-Moreno *et al.* 2017), mientras que si consideramos la población total de sinapsis, son escasas. Nuestros datos parecen contradecir esta hipótesis ya que la proporción de sinapsis perforadas es muy similar en las capas de II a VI. Sin embargo, las sinapsis talamocorticales representan menos del 10% de las sinapsis de la capa IV (da Costa y Martin 2009) y por lo tanto puede que su número no sea lo suficientemente grande como para contribuir a una diferencia significativa respecto al resto de las capas. Las diferencias en las edades y especies estudiadas también deben ser tenidas en cuenta, dado que la proporción de sinapsis perforadas en las capas II/III de las cortezas visual y frontal del ratón adulto (Hsu *et al.* 2017) parecen ser más grandes que las que describimos aquí.

2.5 Curvatura de la superficie de aposición sináptica

La relevancia de la curvatura de la sinapsis se comenzó a discutir en los años 70 cuando Jones and Devon (1978) describieron cambios en la

curvatura al administrar anestésicos en animales de experimentación. Diversos estudios llevaron a concluir que las sinapsis con curvatura positiva (la unión sináptica se proyecta hacia el terminal presináptico) representaban sinapsis funcionales, mientras que las sinapsis con curvatura negativa (la unión sináptica se curva hacia el lado postsináptico) no eran funcionales. Estudios posteriores revocaron esta perspectiva al mostrar que hay otros muchos factores que pueden influir en la curvatura de las sinapsis, por ejemplo, la región estudiada: las sinapsis con curvatura positiva predominan en la corteza mientras que las que tienen curvatura negativa predominan en el hipocampo (Calverley y Jones 1990). No obstante, estudios más recientes sugieren que cambios en la curvatura de la sinapsis pueden influir en la eficacia sináptica (Medvedev *et al.* 2010). En el presente estudio hemos encontrado que la curvatura de las SAS es mayor para sinapsis simétricas que para asimétricas en todas las capas. En el caso de las sinapsis asimétricas, se encontraron diferencias significativas entre todas las capas salvo las capas III y V, mientras que en el caso de las simétricas se encontraron diferencias entre la capa IV y todas las demás capas y entre la capa VI y las demás capas. Por lo tanto, si la curvatura de las sinapsis tiene influencia en la eficacia sináptica, nuestros resultados indican que esta característica depende del tipo de sinapsis y de la capa en la que se encuentre. Sin embargo, no se encontró correlación entre el área de las SAS y su curvatura, ni para las sinapsis asimétricas ni para las simétricas. Dado que el área de las SAS parece estar relacionada con la fuerza de las sinapsis, el significado de las diferencias en la curvatura encontradas entre distintas capas y tipos de sinapsis observadas en este trabajo deberá ser dilucidada en estudios futuros.

3. Estudio de la distribución de mitocondrias en el neuropilo

En este trabajo hemos obtenido estimaciones precisas del porcentaje de tejido ocupado por las mitocondrias en el neuropilo en todas las capas corticales y hemos descrito su distribución en axones, dendritas y elementos no sinápticos. Además, hemos establecido una relación entre la fracción de volumen mitocondrial y la densidad de sinapsis. Las principales aportaciones de nuestro trabajo son las siguientes: (I) la mayor fracción de volumen mitocondrial se encuentra en la capa IV, y la más baja en las capas I y VI. (II) el 58,58 % de la fracción de volumen mitocondrial se localiza en dendritas y axones mientras que la proporción restante se encuentra en elementos no sinápticos. (III) las prolongaciones dendríticas presentan la mayor proporción de mitocondrias (74,38%) en comparación con los axones (25,61%). Además, las mitocondrias se acumulan especialmente en las dendritas, lo que probablemente está relacionado con una mayor demanda energética a nivel postsináptico. (IV) en el caso de los axones, las mitocondrias se encuentran predominantemente en axones excitadores (77,28%) frente a inhibidores (22,72%). No obstante, los axones inhibidores tienden a tener mayor proporción de mitocondrias que los axones excitadores y esta tendencia se incrementa notablemente hacia las capas infragranulares. (V) existe una correlación positiva entre la densidad de sinapsis en el neuropilo y la fracción de volumen mitocondrial.

3.1 Fracción de volumen mitocondrial en la corteza somatosensorial

El estudio de la distribución mitocondrial se ha realizado en series de imágenes que constituyen un volumen tridimensional, lo que permite seguir las fibras a lo largo de varias micras y así identificar su naturaleza axónica, dendrítica o no sináptica. Se han realizado trabajos previos en este campo, no obstante, éstos no utilizaban secciones seriadas de tejido (Carroll y Wong-Riley 1984, Sumpter *et al.* 1986, Wong-Riley 1989) por lo que la precisión de los datos es menor que la obtenida en el presente trabajo. Recientemente se han realizado grandes avances con el uso de secciones seriadas de cortes ultrafinos en el estudio de la distribución de sinapsis y mitocondrias en el cerebro de pacientes con esquizofrenia (Roberts *et al.* 2015).

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos (Chang *et al.* 2006, Sakata y Jones 2003, Takihara *et al.* 2015) que sufren procesos de fisión y fusión de manera constante (Chen y Chan 2005, Dubinsky 2009). Es por ello que, en vez de contar perfiles mitocondriales individuales, hemos calculado el número de mitocondrias presentes en el tejido como la fracción de volumen del neuropilo que es ocupada por mitocondrias. La mayor fracción de volumen mitocondrial se encontró en la capa IV, y la más baja en las capas I y VI. Esta distribución coincide con la densidad de sinapsis descrita anteriormente, para las que la mayor densidad se encuentra en la capa IV y la menor se encuentra en la capa VI. El alto valor de la fracción de volumen mitocondrial en la capa IV podría ser debido a que esta capa representa el principal recipiente de aferencias talámicas, que tienen altas frecuencias de disparo. De este modo, para mantener esta actividad, requerirían una gran densidad de mitocondrias, que se asocian a los reservorios

de vesículas sinápticas (Rodríguez-Moreno *et al.* 2017). No obstante, la capa I también recibe numerosas aferencias talámicas, pero la fracción de volumen mitocondrial es muy baja, por lo que no podemos decir que exista una relación clara entre la fracción de volumen mitocondrial y las aferencias talámicas.

3.2 Proporción de mitocondrias en los distintos compartimentos del neuropilo y su relación con las sinapsis

Las neuronas consumen la mayor parte de la energía en el cerebro, y la mayoría de ésta se usa en la transmisión sináptica, por lo tanto, es esperable encontrar un mayor aporte energético a las prolongaciones axónicas y dendríticas (Attwell y Laughlin 2001, Harris *et al.* 2012, Overly *et al.* 1996) (Figura 36). En este estudio hemos encontrado que al menos el 61,31% de la fracción de volumen mitocondrial se localiza en prolongaciones neuronales y el 38,69% se encuentra en elementos no sinápticos, que engloba las prolongaciones gliales, así como, probablemente, algunos axones y dendritas que no establecen sinapsis dentro del volumen estudiado y que por ello no pudieron ser identificadas como tales. Las mitocondrias se relacionan íntimamente con las sinapsis, y se ha demostrado que pueden estar incluso ancladas a los sitios de fusión de las vesículas en el lado presináptico (Rowland *et al.* 2000), donde no solo proporcionan energía, sino que también actúan como tampones de calcio. La hiperactividad sináptica parece reclutar mitocondrias hacia las sinapsis, mientras que la inactividad sináptica prolongada produciría la liberación de las mitocondrias de esos sitios. El reclutamiento ocurre por variaciones en la proporción de ADP/ATP y alteraciones en el anclaje de las mitocondrias por cambios en la concentración de Ca^{2+} (Harris *et al.* 2012, Li *et al.* 2004, Obashi

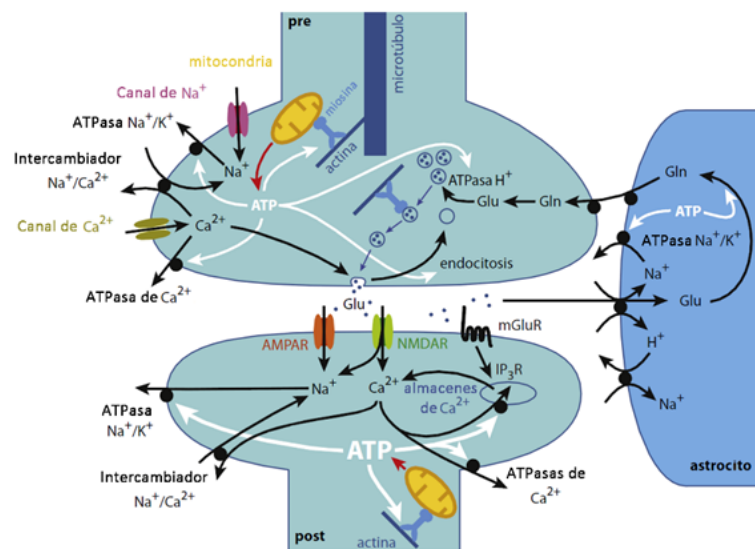


Figura 36. Mecanismos que consumen energía en las sinapsis. A nivel presináptico el ATP se usa en cuatro tipos de ATPasas: la bomba de Na^+ , que saca Na^+ y promueve la salida de Ca^{2+} por el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (y del REL, no mostrado) que disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular; la ATPasa de H^+ vacuolar, que promueve la captación de transmisores por las vesículas; y las proteínas motoras (kinesina, dineína y miosina) que transportan las mitocondrias y las vesículas por la célula. A nivel postsináptico, el consumo de ATP es mayor (indicado con flechas más gruesas) y se da principalmente en el bombeo hacia el exterior de iones implicados en las corrientes sinápticas, y minoritariamente en retornar el Ca^{2+} a los compartimentos intracelulares y en el transporte mitocondrial. En los astrocitos el ATP se usa para sacar Na^+ del citoplasma, mantener el potencial de reposo y en eliminar los iones implicados en la recaptura de glutamato (Glu), y en la conversión de Glu a glutamina (Gln). Modificado de Harris *et al* (2012).

y Okabe 2013).

Pese a que ha sido ampliamente mencionado en estudios previos (Carroll y Wong-Riley 1984, Jones y Powell 1969, Kasthuri *et al.* 2015, Wong-Riley *et al.* 1989), en este estudio no hemos encontrado ninguna mitocondria dentro de una espina dendrítica. La mayoría de los estudios mencionados se realizaron usando micrografías individuales y no secciones seriadas, por lo que hay una gran probabilidad de que lo que estos autores consideraron espinas con mitocondrias fuesen en realidad pequeños segmentos dendríticos y no verdaderas espinas. Sin embargo, otros estudios han observado la presencia de mitocondrias en espinas dendríticas (Chicurel y Harris 1992) y explicado la manera en la que estos orgánulos entran en las espinas (Li *et al.* 2004), aunque se refieren al hipocampo. Por lo tanto, concluimos que la ausencia de mitocondrias podría ser una

característica de las espinas dendríticas corticales, al menos en animales jóvenes.

La proporción entre mitocondrias dendríticas y mitocondrias axónicas es aproximadamente 75:25. Dado que la proporción entre el volumen de neuropilo ocupado por dendritas y el ocupado por axones es 60:40, podemos concluir que las mitocondrias se encuentran más concentradas en las dendritas que en los axones. Nuestros resultados concuerdan con los estudios de consumo energético en los que describe que la mayor parte de la energía dedicada a la señalización sináptica se emplea en bombear iones de sodio fuera de las células (Attwell y Laughlin 2001); dado que el lado postsináptico tiene mayor flujo de sodio, la energía requerida para volver al estado basal después de un evento sináptico es mayor que en lado presináptico (Attwell y Laughlin 2001, Howarth *et al.* 2012). En el lado presináptico,

las mitocondrias proporcionan la energía requerida por la maquinaria de liberación sináptica y por los distintos tipos de transportadores, y además participan en la síntesis de neurotransmisores y en el tamponamiento de Ca^{2+} (Brodin *et al.* 1999). Nuestros resultados están en la línea de observaciones previas realizadas en la corteza visual del mono ardilla, donde se ha descrito que las mitocondrias en axones contribuyen sólo al 10-15% del total (Wong-Riley 1989, Wong-Riley y Carroll 1984). En el caso de las sinapsis inhibitoras, el consumo energético postsináptico es mucho menor, dado que el potencial de reversión del cloro está cerca del potencial de reposo (Attwell y Laughlin 2001, Harris *et al.* 2012, Howarth *et al.* 2012, Howarth *et al.* 2010).

En el caso de los axones, hemos encontrado que las mitocondrias se localizan predominantemente en axones excitadores frente a inhibidores, con una proporción aproximada de 80:20. En este caso, la proporción entre el volumen ocupado por axones excitadores frente a los inhibidores es de 85:15 aproximadamente, de manera que los axones inhibidores son relativamente más ricos en mitocondrias que los excitadores. Estos resultados están en consonancia con estudios que apuntan a un mayor coste metabólico de las neuronas inhibitoras frente a las excitadoras (Howarth *et al.* 2012, Wong-Riley 1989, Wong-Riley y Carroll 1984). En cualquier caso, si tenemos en cuenta la mayor fracción de volumen de axones excitadores presente en el tejido, el consumo energético global de estos será mayor que el de los inhibidores. También hemos encontrado que la proporción de mitocondrias localizadas en axones inhibidores tiende a incrementarse hacia las capas infragranulares, mientras que la fracción de volumen de las fibras inhibitoras desciende. Este fenómeno no se correlaciona con el número de sinapsis inhibitoras en las capas

infragranulares, ya que estas capas presentan la menor densidad sináptica. Es posible, sin embargo, que se relacione con la heterogeneidad funcional de las células inhibitoras en la corteza (Ascoli *et al.* 2008, Markram *et al.* 2015). Las interneuronas de disparo rápido son responsables de las oscilaciones de los circuitos que permiten la actividad sincrónica coordinada durante el funcionamiento normal del cerebro. Dada su elevada actividad eléctrica, consumen más energía que otras interneuronas. Esta energía se obtiene mediante metabolismo oxidativo, y por lo tanto, contienen más mitocondrias (Kann *et al.* 2014). Vistos bajo esta perspectiva, nuestros resultados sugerirían que las interneuronas de disparo rápido son más comunes en las capas más profundas, aunque son necesarios estudios futuros que aclaren este punto.

Por último, dado que las sinapsis consumen una gran cantidad de la energía usada por las neuronas, hemos correlacionado la fracción de volumen mitocondrial con la densidad de sinapsis en cada muestra de neuropilo (Figura 35 C). Nuestros resultados indican que existe una correlación positiva entre la densidad sináptica y la fracción de volumen mitocondrial. La correlación se mantiene entre la densidad sináptica y el volumen mitocondrial contenido en dendritas, pero cae respecto al volumen mitocondrial axónico, como cabe esperar dado que el elemento postsináptico requiere más energía que el presináptico, como se ha comentado más arriba. Por último, resulta interesante destacar que no existe correlación alguna entre la densidad sináptica y las mitocondrias localizadas en elementos no sinápticos.

4. Observaciones finales

Uno de los primeros pasos para comprender la

organización funcional del cerebro es conocer su diseño estructural, y correlacionarlo con las características moleculares y fisiológicas de las células estudiadas. Puesto que los datos cuantitativos tridimensionales disponibles hasta la fecha son escasos y están basados principalmente en casos individuales, los resultados aquí presentados ayudarán a entender mejor la estructura de los microcircuitos, a describir el sinaptoma y a construir modelos corticales más realistas. Considerados en conjunto, nuestros resultados indican que, respecto al número y la

distribución de los distintos tipos de sinapsis, el tamaño y a la forma de las uniones sinápticas y la distribución de mitocondrias, hay similitudes y diferencias específicas de cada capa. Las implicaciones funcionales de estas variaciones son desconocidas, pero podrían estar relacionadas con circuitos sinápticos particulares, característicos de cada capa. Por ello, es necesario complementar este trabajo con estudios futuros realizados a distintos niveles e integrar los datos ultraestructurales con información sobre la morfología y conectividad neuronal, y sus características

VI. CONCLUSIONES

1. Estudio de la densidad y distribución de sinapsis en el neuropilo

- 1.1 Las sinapsis asimétricas superan numéricamente a las simétricas en una proporción de 9:1, y las sinapsis en espinas superan a las sinapsis en tallos dendríticos en una proporción de 8:2.
- 1.2 Tres cuartas partes de las sinapsis presentes en el neuropilo son asimétricas establecidas en espinas. El resto son asimétricas en tallos dendríticos, simétricas en tallos, y simétricas en espinas, en ese orden.
- 1.3 La capa IV es la más rica en sinapsis, tanto asimétricas como simétricas. La capa VI, por el contrario, es la que presenta menor densidad de sinapsis.
- 1.4 Más del 90% de las sinapsis se establecen sobre dendritas con espinas.
- 1.5 Menos del 6% de las espinas establecen más de una sinapsis, y cuando lo hacen la proporción de sinapsis simétricas implicadas aumenta en comparación con las espinas que establecen una única sinapsis.

2. Estudio del tamaño y la forma de las sinapsis en el neuropilo

- 2.1 El tamaño medio de las sinapsis asimétricas es menor que el de las simétricas en todas las capas corticales.
- 2.2 Las sinapsis de la capa III son las de mayor tamaño medio, mientras que las de menor tamaño medio se encuentran en la capa IV.
- 2.3 La distribución de los tamaños de las uniones sinápticas corresponde a una distribución log-normal, con ligeras variaciones entre las capas corticales.
- 2.4 La gran mayoría de las de las sinapsis corticales (más del 90%) tienen una densidad postsináptica de forma macular. Las sinapsis perforadas y en herradura presentan un tamaño medio mayor que el de las maculares, no obstante, no está claro que pertenezcan a grupos diferenciados.
- 2.5 La curvatura de las uniones sinápticas es mayor para las sinapsis simétricas que para las asimétricas. No existe correlación entre la curvatura y el área sináptica.

3. Estudio de la distribución de mitocondrias en el neuropilo

- 3.1 La fracción de volumen de neuropilo ocupada por mitocondrias varía entre el 4% y el 8% aproximadamente, alcanzando el máximo en la capa IV, y el mínimo en las capas I y VI.
- 3.2 El volumen de neuropilo ocupado por mitocondrias dendríticas triplica al de las axónicas. Esto no se debe únicamente a que en el neuropilo haya una mayor proporción de dendritas que de axones, sino a que las dendritas son, además, proporcionalmente más ricas en mitocondrias.
- 3.3 En el caso de los axones, las mitocondrias se encuentran predominantemente en axones excitadores frente a los inhibidores, con una proporción de 80:20. No obstante, los axones inhibidores tienen mayor proporción de mitocondrias que los excitadores y esta tendencia se incrementa notablemente hacia las capas infragranulares.
- 3.4 Existe una correlación positiva entre la densidad de sinapsis en el neuropilo y la fracción de volumen mitocondrial, especialmente en lo que se refiere a las mitocondrias dendríticas. Esta correlación es menor para las mitocondrias axónicas y desaparece con las mitocondrias localizadas en elementos no sinápticos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Akers RM, Killackey HP. 1978. Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 181: 513-37
- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, DeFelipe J. 2008. Gender differences in human cortical synaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14615-19
- Alonso-Nanclares L, Merino-Serrais P, Gonzalez S, DeFelipe J. 2013. Synaptic changes in the dentate gyrus of APP/PS1 transgenic mice revealed by electron microscopy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 72: 386-95
- Alonso-Nanclares L, White EL, Elston GN, DeFelipe J. 2004. Synaptology of the proximal segment of pyramidal cell basal dendrites. *European Journal of Neuroscience* 19: 771-6
- Anton-Sanchez L, Bielza C, Merchan-Perez A, Rodriguez JR, DeFelipe J, Larranaga P. 2014. Three-dimensional distribution of cortical synapses: a replicated point pattern-based analysis. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8: 85
- Anton-Sanchez L, Larranaga P, Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, DeFelipe J, Bielza C. 2017. Three-dimensional spatial modeling of spines along dendritic networks in human cortical pyramidal neurons. *PLoS One* 12: e0180400
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neuroscience*. 22: 208-15
- Araya R. 2014. Input transformation by dendritic spines of pyramidal neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*. 8: 141
- Araya R, Jiang J, Eisenthal KB, Yuste R. 2006. The spine neck filters membrane potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 17961-66
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. 2007a. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience* 1: 131-43
- Arellano JI, Espinosa A, Fairen A, Yuste R, DeFelipe J. 2007b. Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* 145: 464-9
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, *et al.* 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 9: 557-68
- Attwell D, Laughlin SB. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21: 1133-45
- Baude A, Nusser Z, Roberts JDB, Mulvihill E, Jeffrey McIlhinney RA, Somogyi P. 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11: 771-87
- Beal MF. 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of neurology* 58: 495-505
- Beaulieu C, Colonnier M. 1985. A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *The Journal of comparative neurology* 231: 180-9
- Beaulieu C, Somogyi P. 1990. Targets and Quantitative Distribution of GABAergic Synapses in the Visual Cortex of the Cat. *European Journal of Neuroscience* 2: 896
- Benavides-Piccione R, DeFelipe J. 2003. Different populations of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons defined by differential expression of nitric oxide synthase in the human temporal cortex. *Cerebral Cortex* 13: 297-307
- Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, Robles V, Yuste R, DeFelipe J. 2013. Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cerebral Cortex* 23: 1798-810
- Bloodgood BL, Sabatini BL. 2007. Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Current opinion in neurobiology* 17: 345-51
- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KA, Schuhknecht GF. 2017. An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *Journal of Neuroscience* 37: 2435-48

- Bosch C, Martinez A, Masachs N, Teixeira CM, Fernaud I, *et al.* 2015. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Frontiers in Neuroanatomy* 9: 60
- Bosch C, Masachs N, Exposito-Alonso D, Martínez A, Teixeira CM, *et al.* 2016. Reelin Regulates the Maturation of Dendritic Spines, Synaptogenesis and Glial Ensheathment of Newborn Granule Cells. *Cerebral Cortex* 26: 4282-98
- Braitenberg V, Schüz A. 1998. *Cortex: statistics and geometry of neuronal connectivity*. New York: Springer. 272 pp.
- Branco T, Marra V, Staras K. 2010. Examining size-strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *Journal of structural biology* 172: 203-10
- Brodin L, Bakeeva L, Shupliakov O. 1999. Presynaptic mitochondria and the temporal pattern of neurotransmitter release. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354: 365-72
- Brodmann K, Gary LJ. 2006. *Brodmann's localisation in the cerebral cortex : the principles of comparative localisation in the cerebral cortex based on cytoarchitectonics*. New York, NY: Springer. xv, 298 p. pp.
- Broskey NT, Daraspe J, Humbel BM, Amati F. 2013. Skeletal muscle mitochondrial and lipid droplet content assessed with standardized grid sizes for stereology. *Journal of Applied Physiology* 115: 765-70
- Buzsaki G, Mizuseki K. 2014. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nature Reviews Neuroscience* 15: 264-78
- Calverley RK, Jones DG. 1987. A serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. *Cell and tissue research* 247: 565-72
- Calverley RK, Jones DG. 1990. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain research reviews* 15: 215-49
- Carlin RK, Siekevitz P. 1983. Plasticity in the central nervous system: do synapses divide? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 3517-21
- Carroll EW, Wong-Riley MTT. 1984. Quantitative light and electron-microscopic analysis of cytochrome oxidase-rich zones in the striate cortex of the squirrel-monkey. *Journal of Comparative Neurology* 222: 1-17
- Catsman-Berrevoets CE, Kuypers HG. 1976. Cells of origin of cortical projections to dorsal column nuclei, spinal cord and bulbar medial reticular formation in the rhesus monkey. *Neuroscience letters* 3: 245-52
- Clasca F, Rubio-Garrido P, Jabaudon D. 2012. Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes. *European Journal of Neuroscience* 35: 1524-32
- Colonnier M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain research* 9: 268-87
- Connors BW, Long MA. 2004. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annual Review of Neuroscience* 27: 393-418
- Chang DT, Honick AS, Reynolds IJ. 2006. Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 26: 7035-45
- Cheetham CE, Barnes SJ, Albieri G, Knott GW, Finnerty GT. 2014. Pansynaptic enlargement at adult cortical connections strengthened by experience. *Cerebral Cortex* 24: 521-31
- Chen H, Chan DC. 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2: R283-9
- Cheung AFP, Pollen AA, Tavare A, DeProto J, Molnár Z. 2007. Comparative aspects of cortical neurogenesis in vertebrates. *Journal of Anatomy* 211: 164-76
- Chicurel ME, Harris KM. 1992. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat

- hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* 325: 169-82
- Chiu CQ, Lur G, Morse TM, Carnevale NT, Ellis-Davies GCR, Higley MJ. 2013. Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science* 340: 759-62
- Choquet D, Triller A. 2013. The dynamic synapse. *Neuron* 80: 691-703
- da Costa NM, Martin KA. 2009. The proportion of synapses formed by the axons of the lateral geniculate nucleus in layer 4 of area 17 of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 516: 264-76
- de Vivo L, Bellesi M, Marshall W, Bushong EA, Ellisman MH, *et al.* 2017. Ultrastructural evidence for synaptic scaling across the wake/sleep cycle. *Science* 355: 507-10
- DeFelipe J. 2011. The Evolution of the Brain, the Human Nature of Cortical Circuits, and Intellectual Creativity. *Frontiers in Neuroanatomy* 5: 29
- DeFelipe J. 2015a. The anatomical problem posed by brain complexity and size: a potential solution. *Frontiers in Neuroanatomy* 9: 104
- DeFelipe J. 2015b. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy* 9: 14
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano J, Ballesteros-Yáñez I, Benavides-Piccione R, Muñoz A. 2007. 4.12 - Specializations of the Cortical Microstructure of Humans A2 - Kaas, Jon H In *Evolution of Nervous Systems*, pp. 167-90. Oxford: Academic Press
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. 2002. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of neurocytology* 31: 299-316
- DeFelipe J, Fairen A. 1993. A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41: 769-72
- DeFelipe J, Fariñas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology* 39: 563-607
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Molinari M, Jones EG. 1990. A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience* 37: 655-73
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG. 1989. Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. *Brain research* 503: 49-54
- DeFelipe J, Jones EG. 1988. A light and electron microscopic study of serotonin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey sensory-motor cortex. *Experimental Brain Research* 71: 171-82
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchán-Pérez A. 1999. Estimation of the Number of Synapses in the Cerebral Cortex: Methodological Considerations. *Cerebral Cortex* 9: 722-32
- DeFelipe J, Marco P, Fairen A, Jones EG. 1997. Inhibitory synaptogenesis in mouse somatosensory cortex. *Cerebral Cortex* 7: 619-34
- DeFelipe J, Markram H, Rockland K. 2012. The Neocortical Column. *Frontiers in Neuroanatomy* 6
- Descarries L, Mechawar N. 2000. Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system In *Progress in brain research*, pp. 27-47: Elsevier
- Douglas RJ, Martin KA. 2004. Neuronal circuits of the neocortex. *Annual Review of Neuroscience* 27: 419-51
- Dubinsky JM. 2009. Heterogeneity of nervous system mitochondria: location, location, location! *Experimental neurology* 218: 293-307
- Dufour A, Rollenhagen A, Satzler K, Lubke JH. 2016. Development of Synaptic Boutons in Layer 4 of the Barrel Field of the Rat Somatosensory Cortex: A Quantitative Analysis. *Cerebral Cortex* 26: 838-54
- Eroglu C, Barres BA. 2010. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468: 223-31
- Eyal G, Mansvelder HD, de Kock CP, Segev I. 2014. Dendrites impact the encoding capabilities of the axon. *Journal of Neuroscience* 34: 8063-71

-
- Fauth M, Tetzlaff C. 2016. Opposing Effects of Neuronal Activity on Structural Plasticity. *Frontiers in Neuroanatomy* 10: 75
- Feldman ML. 1984. Morphology of the neocortical Pyramidal neuron. In *Cerebral Cortex*, ed. A Peters, EG Jones, pp. 123-200. New York: Plenum Press
- Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cerebral Cortex* 1: 1-47
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *Journal of Neuroscience*. 18: 8900-11
- Fifková E, Delay RJ. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology* 95: 345-50
- Franks KM, Bartol TM, Jr., Sejnowski TJ. 2002. A Monte Carlo model reveals independent signaling at central glutamatergic synapses. *Biophysical journal* 83: 2333-48
- Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y. 2004a. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *Journal of Comparative Neurology* 468: 86-95
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y. 2004b. Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. *Neuroscience* 125: 615-23
- García-López P, García-Marín V, Freire M. 2010. Dendritic spines and development: towards a unifying model of spinogenesis--a present day review of Cajal's histological slides and drawings. *Neural Plasticity* : 1-29
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE, Rossi M, Parshall RF. 1993. Structural synaptic correlate of long-term potentiation: formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones. *Hippocampus* 3: 435-45
- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L. 1987. Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections. *Brain research* 423: 179-88
- Giese KP, Aziz W, Kraev I, Stewart MG. 2015. Generation of multi-innervated dendritic spines as a novel mechanism of long-term memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 124: 48-51
- Glasser MF, Coalson TS, Robinson EC, Hacker CD, Harwell J, *et al.* 2016. A multi-modal parcellation of human cerebral cortex. *Nature* 536: 171-8
- Gray EG. 1959a. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Journal of Anatomy* 93: 420-33
- Gray EG. 1959b. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183: 1592-3
- Grimnes S, Martinsen ØG. 2015. Chapter 5 - Excitable Tissue and Bioelectric Signals. In *Bioimpedance and Bioelectricity Basics* (Third Edition), pp. 119-39. Oxford: Academic Press
- Gulledge AT, Carnevale NT, Stuart GJ. 2012. Electrical advantages of dendritic spines. *PLoS One* 7: e36007
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, *et al.* 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 96: 857-81
- Haber SN. 2016. Corticostriatal circuitry. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 18: 7-21
- Hadzic M, Jack A, Wahle P. 2017. Ionotropic glutamate receptors: Which ones, when, and where in the mammalian neocortex. *Journal of Comparative Neurology* 525: 976-1033
- Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. 2012. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75: 762-77

- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 12: 2685-705
- Harris KM, Kater SB. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annual Review of Neuroscience* 17: 341-71
- Hilgetag CC, Barbas H. 2009. Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Structure and Function* 213: 365-66
- Holbro N, Grunditz A, Oertner TG. 2009. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 15055-60
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rozsa B, Kulik A, *et al.* 2012. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature Neuroscience* 15: 988-97
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-9
- Houser CR, Barber RP, Vaughn JE. 1984. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in the dorsal lateral vestibular nucleus: evidence for an intrinsic and extrinsic GABAergic innervation. *Neuroscience letters* 47: 213-20
- Howarth C, Gleeson P, Attwell D. 2012. Updated Energy Budgets for Neural Computation in the Neocortex and Cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32: 1222-32
- Howarth C, Peppiatt-Wildman CM, Attwell D. 2010. The energy use associated with neural computation in the cerebellum. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30: 403-14
- Hsu A, Luebke JI, Medalla M. 2017. Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. *Journal of Comparative Neurology* 525: 2175-91
- Hugel S, Abegg M, de Paola V, Caroni P, Gähwiler BH, McKinney RA. 2009. Dendritic spine morphology determines membrane-associated protein exchange between dendritic shafts and spine heads. *Cerebral Cortex* 19: 697-702
- Ikegaya Y, Sasaki T, Ishikawa D, Honma N, Tao K, *et al.* 2013. Interpyramid spike transmission stabilizes the sparseness of recurrent network activity. *Cerebral Cortex* 23: 293-304
- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, *et al.* 2015. Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science* 350
- Jones DG, Calverley RK. 1991. Perforated and non-perforated synapses in rat neocortex: three-dimensional reconstructions. *Brain research* 556: 247-58
- Jones DG, Devon RM. 1978. An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization. *Brain research* 147: 47-63
- Jones EG. 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cerebral Cortex* 3: 361-72
- Jones EG, Powell TP. 1969. Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *Journal of Cell Science* 5: 509-29
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kann O, Papageorgiou IE, Draguhn A. 2014. Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 34: 1270-82
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. 2010a. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neuroscience*. 33: 121-9
- Kasai H, Hayama T, Ishikawa M, Watanabe S, Yagishita S, Noguchi J. 2010b. Learning rules and persistence of dendritic spines. *European Journal of Neuroscience* 32: 241-9
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003. Structure-stability-function

- relationships of dendritic spines. *Trends in Neuroscience* 26: 360-8
- Kasthuri N, Hayworth KJ, Berger DR, Schalek RL, Conchello JA, *et al.* 2015. Saturated Reconstruction of a Volume of Neocortex. *Cell* 162: 648-61
- Katz LC, Shatz CJ. 1996. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-38
- Kawaguchi Y, Karube F, Kubota Y. 2006. Dendritic branch typing and spine expression patterns in cortical nonpyramidal cells. *Cerebral Cortex* 16: 696-711
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1998. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85: 677-701
- Kemper TL, Galaburda AM. 1984. Principles of cytoarchitectonics In *Cerebral cortex*, ed. A Peters, EG Jones. New York: Plenum Press
- Kharazia VN, Weinberg RJ. 1999. Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *Journal of Comparative Neurology* 412: 292-302
- Kirkcaldie MTK. 2012. Chapter 4 - Neocortex A2 - Watson, Charles In *The Mouse Nervous System*, ed. G Paxinos, L Puelles, pp. 52-111. San Diego: Academic Press
- Kisvarday ZF, Martin KA, Freund TF, Maglóczy Z, Whitteridge D, Somogyi P. 1986. Synaptic targets of HRP-filled layer III pyramidal cells in the cat striate cortex. *Experimental Brain Research* 64: 541-52
- Kisvarday ZF, Martin KA, Friedlander MJ, Somogyi P. 1987. Evidence for interlaminar inhibitory circuits in the striate cortex of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 260: 1-19
- Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D, Somogyi P. 1985. Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *Journal of Comparative Neurology* 241: 111-37
- Kneussel M, Hausrat TJ. 2016. Postsynaptic Neurotransmitter Receptor Reserve Pools for Synaptic Potentiation. *Trends in Neuroscience* 39: 170-82
- Knott G, Holtmaat A. 2008. Dendritic spine plasticity—Current understanding from in vivo studies. *Brain Research Reviews* 58: 282-89
- Konur S, Rabinowitz D, Fenstermaker VL, Yuste R. 2003. Systematic regulation of spine sizes and densities in pyramidal neurons. *Journal of Neurobiology* 56: 95-112
- Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y. 2007. Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *Journal of Neuroscience* 27: 1139-50
- Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N, *et al.* 2015. Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *eLife* 4
- Künzle H. 1977. Projections from the primary somatosensory cortex to basal ganglia and thalamus in the monkey. *Experimental Brain Research* 30: 481-92
- Larkman AU. 1991. Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *Journal of Comparative Neurology* 306: 332-43
- Leergaard TB, Lillehaug S, De Schutter E, Bower JM, Bjaalie JG. 2006. Topographical organization of pathways from somatosensory cortex through the pontine nuclei to tactile regions of the rat cerebellar hemispheres. *European Journal of Neuroscience* 24: 2801-12
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC. 2009. The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61: 301-16
- Lerma J. 1997. Receptores postsinápticos de neurotransmisores. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Madrid)*.
- Lerma J. 2003. Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 481-95
- Li TP, Blanpied TA. 2016. Control of Transmembrane Protein Diffusion within the Postsynaptic Density Assessed by Simultaneous Single-Molecule

- Tracking and Localization Microscopy. *Frontiers in synaptic neuroscience* 8: 19
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119: 873-87
- Lisman J. 2017. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372
- Loane DJ, Kumar A. 2016. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental neurology* 275: 316-27
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JDB, Shigemoto R, Somogyi P. 1996. Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 8: 1488-500
- Mabuchi M, Kusama T. 1966. The cortico-rubral projection in the cat. *Brain research* 2: 254-73
- Major G, Larkum ME, Schiller J. 2013. Active properties of neocortical pyramidal neuron dendrites. *Annual Review of Neuroscience* 36: 1-24
- Mansouri M, Kasugai Y, Fukazawa Y, Bertaso F, Raynaud F, *et al.* 2015. Distinct subsynaptic localization of type 1 metabotropic glutamate receptors at glutamatergic and GABAergic synapses in the rodent cerebellar cortex. *European Journal of Neuroscience* 41: 157-67
- Markov NT, Misery P, Falchier A, Lamy C, Vezoli J, *et al.* 2011. Weight consistency specifies regularities of macaque cortical networks. *Cerebral Cortex* 21: 1254-72
- Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M, *et al.* 2015. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell* 163: 456-92
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 793-807
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* 4: 1086-92
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429: 761-66
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR. 2010. Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8836-41
- Medvedev NI, Popov VI, Dallerac G, Davies HA, Laroche S, *et al.* 2010. Alterations in synaptic curvature in the dentate gyrus following induction of long-term potentiation, long-term depression, and treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist CPP. *Neuroscience* 171: 390-7
- Merchan-Perez A, Rodriguez JR, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J. 2009. Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Frontiers in Neuroanatomy* 3: 14
- Merchan-Perez A, Rodriguez JR, Gonzalez S, Robles V, Defelipe J, *et al.* 2014. Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study. *Cerebral Cortex* 24: 1579-88
- Micheva KD, Beaulieu C. 1996. Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *Journal of Comparative Neurology* 373: 340-54
- Miller M, Peters A. 1981. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *Journal of Comparative Neurology* 203: 555-73
- Mironov A. 2017. Stereological morphometric grids for ImageJ. *Ultrastructural pathology* 41: 126
- Molnar Z, Clowry G. 2012. Cerebral cortical development in rodents and primates. *Progress in brain research* 195: 45-70
- Montes J, Pena JM, DeFelipe J, Herreras O, Merchan-Perez A. 2015. The influence of synaptic size on

-
- AMPA receptor activation: a Monte Carlo model. *PLoS One* 10: e0130924
- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodriguez J-R, Defelipe J, Rodriguez A, Merchán-Pérez A. 2011. Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Frontiers in Neuroanatomy* 5: 18
- Morales J, Benavides-Piccione R, Dar M, Feraud I. 2014. Random positions of dendritic spines in human cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 34: 10078-84
- Morales J, Rodríguez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchán-Pérez A. 2013. Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Frontiers in Neuroanatomy* 7: 10
- Mountcastle VB. 1997. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120: 701-22
- Niswender CM, Conn PJ. 2010. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 295-322
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21: 545-59
- Obashi K, Okabe S. 2013. Regulation of mitochondrial dynamics and distribution by synapse position and neuronal activity in the axon. *European Journal of Neuroscience* 38: 2350-63
- Overly CC, Rieff HI, Hollenbeck PJ. 1996. Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *Journal of Cell Science* 109: 971-80
- Pakkenberg B, Pelvig D, Mørner L, Bundgaard MJ, Gundersen HJG, *et al.* 2003. Aging and the human neocortex. *Experimental Gerontology* 38: 95-99
- Paxinos G, ed. 2004. *The Rat Nervous System*. New York: Elsevier Academic Press. 1328 pp. 3rd ed.
- Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. : Academic Press
- Perea G, Araque A. 2010. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain research reviews* 63: 93-102
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy* 127: 321-55
- Peters A, Palay SL, Webster HD. 1991. *The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells*. New York: Oxford University Press. 528 pp.
- Petrak LJ, Harris KM, Kirov SA. 2005. Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission. *Journal of Comparative Neurology* 484: 183-90
- Pinheiro P, Mulle C. 2006. Kainate receptors. *Cell and tissue research* 326: 457-82
- Popov VI, Deev AA, Klimenko OA, Kraev I V, Kuz'minykh SB, *et al.* 2005. Three-dimensional reconstruction of synapses and dendritic spines in the rat and ground squirrel hippocampus: new structural-functional paradigms for synaptic function. *Neuroscience and behavioral physiology* 35: 333-41
- Porrero C, Rubio-Garrido P, Avendano C, Clasca F. 2010. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Research* 1345: 59-72
- Pozzan T, Magalhães P, Rizzuto R. 2000. The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium* 28: 279-83
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature Neuroscience* 14: 1227-35
- Radwanska K, Medvedev NI, Pereira GS, Engmann O, Thiede N, *et al.* 2011. Mechanism for long-term memory formation when synaptic strengthening is impaired. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 18471-5
- Roberts RC, Barksdale KA, Roche JK, Lahti AC. 2015. Decreased synaptic and mitochondrial density in the postmortem anterior cingulate cortex in

- schizophrenia. *Schizophrenia Research* 168: 543-53
- Rodriguez-Moreno J, Rollenhagen A, Arlandis J, Santuy A, Merchan-Pérez A, *et al.* 2017. Quantitative 3D Ultrastructure of Thalamocortical Synapses from the "Lemniscal" Ventral Posteromedial Nucleus in Mouse Barrel Cortex. *Cerebral Cortex* : 1-17
- Rollenhagen A, Klook K, Satzler K, Qi G, Anstötz M, *et al.* 2015. Structural determinants underlying the high efficacy of synaptic transmission and plasticity at synaptic boutons in layer 4 of the adult rat 'barrel cortex'. *Brain Structure and Function* 220: 3185-209
- Rowland KC, Irby NK, Spirou GA. 2000. Specialized Synapse-Associated Structures within the Calyx of Held. *Journal of Neuroscience* 20: 9135-44
- Sakata JT, Jones TA. 2003. Synaptic mitochondrial changes in the motor cortex following unilateral cortical lesions and motor skills training in adult male rats. *Neuroscience letters* 337: 159-62
- Santos E, Noggle CA. 2011. Synaptic Pruning In *Encyclopedia of Child Behavior and Development*, ed. S Goldstein, JA Naglieri, pp. 1464-65. Boston, MA: Springer US
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *Journal of Neuroscience* 17: 5858-67
- Schikorski T, Stevens CF. 1999. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4107-12
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, *et al.* 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9: 676-82
- Schubert D, Kotter R, Staiger JF. 2007. Mapping functional connectivity in barrel-related columns reveals layer- and cell type-specific microcircuits. *Brain Structure and Function* 212: 107-19
- Schuz A. 1981. Prenatal development and postnatal changes in the guinea pig cortex: microscopic evaluation of a natural deprivation experiment. I. Prenatal development. *Journal fur Hirnforschung* 22: 93-111
- Schüz A, Palm G. 1989. Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *Journal of Comparative Neurology* 286: 442-55
- Selemon LD. 2013. A role for synaptic plasticity in the adolescent development of executive function. *Translational psychiatry* 3: e238
- Sheng M, Kim E. 2011. The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 3: a005678
- Sheng M, Sala C. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annual Review in Neuroscience* 24: 1-29
- Silberberg G. 2008. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Current opinion in neurobiology* 18: 332-7
- Skeberdis VA, Chevalleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, *et al.* 2006. Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nature Neuroscience* 9: 501-10
- Somogyi P, Cowey A. 1981. Combined Golgi and electron microscopic study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. *Journal of Comparative Neurology* 195: 547-66
- Somogyi P, Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D. 1983. Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience* 10: 261-94
- Somogyi P, Smith AD. 1979. Projection of neostriatal spiny neurons to the substantia nigra - application of a combined golgi-staining and horseradish-peroxidase transport procedure at both light and electron-microscopic levels. *Brain Research* 178: 3-15
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH. 1998. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain research reviews* 26: 113-35
- Song S, Sjostrom PJ, Reigl M, Nelson S, Chklovskii DB. 2005. Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits. *PLoS biology* 3: e68
- Sorra KE, Fiala JC, Harris KM. 1998. Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal

- synapse formation. *Journal of Comparative Neurology* 398: 225-40
- Staiger JF, Flagmeyer I, Schubert D, Zilles K, Kotter R, Luhmann HJ. 2004. Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex: quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cerebral Cortex* 14: 690-701
- Sumpter PQ, Mann DM, Davies CA, Yates PO, Snowden JS, Neary D. 1986. An ultrastructural analysis of the effects of accumulation of neurofibrillary tangle in pyramidal neurons of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Neuropathology and applied neurobiology* 12: 305-19
- Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, *et al.* 2015. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 10515-20
- Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E, Ottersen OP. 1999. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature Neuroscience* 2: 618-24
- Tang Y, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Gundersen HJ. 1997. Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation. *Neurobiology of Aging* 18: 609-15
- Tao M, You CP, Zhao RR, Liu SJ, Zhang ZH, *et al.* 2014. Animal mitochondria: evolution, function, and disease. *Current molecular medicine* 14: 115-24
- Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, *et al.* 2009. Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *Journal of Neuroscience* 29: 12896-908
- Thomson A, Lamy C. 2007. Functional maps of neocortical local circuitry. *Frontiers in Neuroscience* 1
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Povilaitite P, Parisi L, Muller D. 2001. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 21: 6245-51
- Triarhou LC. 2006. The signalling contributions of Constantin von Economo to basic, clinical and evolutionary neuroscience. *Brain Research Bulletin* 69: 223-43
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, *et al.* 1999. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23: 583-92
- Verkhatsky A, Butt A. 2007. Morphology of Glial Cells In *Glial Neurobiology*, pp. 21-28: John Wiley & Sons, Ltd
- Vlachos A, Korkotian E, Schonfeld E, Copanaki E, Deller T, Segal M. 2009. Synaptopodin regulates plasticity of dendritic spines in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 29: 1017-33
- Von Economo C. 1929. The Cytoarchitectonics of the Human Cerebral Cortex. *Journal of Anatomy* 63: 389-89
- Wallace DC. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-8
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, *et al.* 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-30
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, *et al.* 2004. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *Journal of Physiology* 561: 65-90
- Weisberg JA, Rustioni A. 1979. Differential projections of cortical sensorimotor areas upon the dorsal column nuclei of cats. *Journal of Comparative Neurology* 184: 401-21
- White EL. 2007. Reflections on the specificity of synaptic connections. *Brain research reviews* 55: 422-9
- White EL, Keller A. 1989. *Cortical Circuits: Synaptic Organization of the Cerebral Cortex. Structure, Function and Theory.* Boston: Birkhäuser.
- Wilson VJ, Zarzecki P, Schor RH, Isu N, Rose PK, *et al.* 1999. Cortical influences on the vestibular nuclei of the cat. *Experimental Brain Research* 125: 1-13

- Wong-Riley MT. 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neuroscience* 12: 94-101
- Wong-Riley MT, Carroll EW. 1984. Quantitative light and electron microscopic analysis of cytochrome oxidase-rich zones in V II prestriate cortex of the squirrel monkey. *Journal of Comparative Neurology* 222: 18-37
- Wong-Riley MT, Trusk TC, Tripathi SC, Hoppe DA. 1989. Effect of retinal impulse blockage on cytochrome oxidase-rich zones in the macaque striate cortex: II. Quantitative electron-microscopic (EM) analysis of neuropil. *Visual neuroscience* 2: 499-514
- Yuste R. 2010. *Dendritic Spines*. Massachusetts: MIT. 264 pp.
- Yuste R. 2013. Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annual Review of Neuroscience* 36: 429-49
- Yuste R, Bonhoeffer T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature reviews. Neuroscience* 5: 24-34
- Yuste R, Majewska A, Holthoff K. 2000. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nature Neuroscience*. 3: 653-59

VIII. ANEXO

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex.
(2017) *Brain Structure and Function*.



ORIGINAL ARTICLE

Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex

A. Santuy^{1,3} · J. R. Rodriguez^{1,2,3} · J. DeFelipe^{1,2,3} · A. Merchán-Pérez^{1,3,4} Received: 15 February 2017 / Accepted: 4 July 2017
© The Author(s) 2017. This article is an open access publication

Abstract Knowing the proportions of asymmetric (excitatory) and symmetric (inhibitory) synapses in the neuropil is critical for understanding the design of cortical circuits. We used focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB/SEM) to obtain stacks of serial sections from the six layers of the juvenile rat (postnatal day 14) somatosensory cortex (hindlimb representation). We segmented in three-dimensions 6184 synaptic junctions and determined whether they were established on dendritic spines or dendritic shafts. Of all these synapses, 87–94% were asymmetric and 6–13% were symmetric. Asymmetric synapses were preferentially located on dendritic spines in all layers (80–91%) while symmetric synapses were mainly located on dendritic shafts (62–86%). Furthermore, we found that less than 6% of the dendritic spines establish more than one synapse. The vast majority of axospinous synapses were established on the spine head. Synapses on the spine neck were scarce, although they were more

common when the dendritic spine established multiple synapses. This study provides a new large quantitative dataset that may contribute not only to the knowledge of the ultrastructure of the cortex, but also towards defining the connectivity patterns through all cortical layers.

Keywords Excitatory synapses · Dendritic shafts · Somatosensory cortex · Dendritic spines · Inhibitory synapses · Serial section three-dimensional reconstruction · Dual-beam electron microscopy · FIB/SEM

Introduction

The cerebral cortex displays a highly complex synaptic organization but there are general rules that can be applied—albeit with a certain degree of variation—to all the cortical areas and species examined (DeFelipe 2011). Most cortical synapses (90–98%) are established in the neuropil (Alonso-Nanclares et al. 2008), which is composed of dendrites, axons and glial processes. There are two main morphological types of synapses that can be identified based on morphological criteria—asymmetric and symmetric synapses (Colonnier 1968; Gray 1959). This distinction is important because, in general, asymmetric synapses (AS) are excitatory (glutamatergic) and symmetric synapses (SS) are inhibitory (GABAergic) (Ascoli et al. 2008). Although it has been described that terminals that establish AS and SS can synthesize neurotransmitters other than glutamate and GABA, respectively, such as acetylcholine, serotonin, noradrenaline or dopamine, a large proportion of these axonal systems are non-synaptic (Beaulieu and Somogyi 1990; DeFelipe and Jones 1988; Descarries and Mechawar 2000). Therefore, it follows that AS and SS that use acetylcholine, serotonin,

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00429-017-1470-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ A. Merchán-Pérez
amerchan@fi.upm.es

¹ Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain

² Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain

³ CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain

⁴ Departamento de Arquitectura y Tecnología de sistemas Informáticos, Universidad Politécnica de Madrid, Boadilla del Monte, 28660 Madrid, Spain

noradrenaline or dopamine must represent a very small proportion of the total number of AS and SS. Synapses can be established on dendritic spines (for simplicity, spines) which are mostly present in excitatory neurons, or on dendritic shafts of either excitatory or inhibitory neurons. Excitatory synapses are the most abundant (80–90% of all cortical synapses) and originate from cortical spiny neurons and extrinsic cortical afferents, while inhibitory synapses are less numerous (about 10–20%) and mainly originate from local interneurons (Beaulieu and Colonnier 1985; DeFelipe 2011; DeFelipe and Fariñas 1992; Feldman 1984; Silberberg 2008; White 2007; White and Keller 1989). Thus, knowing the proportions of AS and SS synapses and their distribution on spines and dendritic shafts is critical for understanding the design of cortical circuits. Of particular interest is the study of spines. These structures were described for the first time by Cajal in 1888 (DeFelipe 2015) and since then spines have been studied using multiple techniques as they are thought to be key elements in memory, learning and cognition (Yuste 2010). In general, it is assumed that the majority of excitatory synapses are established on spines with a ratio of one spine/one synapse. However, it has been reported that some spines lack synapses, while other spines can have multiple synapses (Feldman 1984; Harris et al. 1992; Harris and Kater 1994; Jones and Powell 1969; Popov et al. 2005).

The identification of AS and SS and the proportions of these synapses in the neuropil is relatively easy, using conventional electron microscope techniques (DeFelipe et al. 1999) as it does not require the examination of long series of sections, which is a major limitation of conventional electron microscopy. However, the identification of the postsynaptic structure (i.e., whether the synapse is established on a spine or on a dendritic shaft) often requires the examination of several consecutive sections. In addition, determining whether spines receive one or more synapses and the morphological type of these axospinous synapses are major challenges. Overcoming such challenges requires the use of electron microscopy with serial section 3D reconstruction. Here is where automated or semi-automated electron microscopy techniques come into play (Denk and Horstmann 2004; Helmstaedter 2013; Knott et al. 2008; Merchan-Perez et al. 2009; Morgan and Lichtman 2013; Smith 2007)—techniques that involve much less-demanding human interaction and training than for conventional electron microscopy.

Here, we use a dual-beam electron microscope that combines a focused ion beam (FIB) column that mills the sample and a scanning electron microscope (SEM) that images the freshly exposed surface. Combining both beams sequentially, we obtain long series of images that represent three-dimensional samples of tissue. This technique has been used before for the study of synapses and several

software packages have been developed to analyze the images obtained (Knott et al. 2008; Kreshuk et al. 2011; Merchan-Perez et al. 2009, 2014; Morales et al. 2011, 2013). In this work, we have studied the proportions of AS and SS on spines and dendritic shafts in the neuropil of all cortical layers of the somatosensory cortex of Wistar rats on postnatal day 14 (P14). We have used P14 rats with the aim of integrating the present data with other anatomical, molecular and physiological data that have been obtained in the same cortical region of P14 rats, to create biologically accurate large-scale cortical models (Markram et al. 2015). The densities of the different types of synapses have been quantified across all cortical layers, as well as the occurrence of single or multiple synapses on the same spine.

Materials and methods

Tissue preparation

Three male Wistar rats killed on postnatal day 14 were used for this study. Animals were administered a lethal intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg) and were intracardially perfused with 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). The brain was then extracted from the skull and processed for electron microscopy as previously described (Merchan-Perez et al. 2009). Briefly, the brains were extracted from the skull and post-fixed at 4 °C overnight in the same solution used for perfusion. They were then washed in PB and vibratome sections (150 µm thick) were obtained. Sections containing the primary somatosensory cortex (hindlimb representation) were selected with the help of an atlas (Paxinos and Watson 2007). Selected sections were osmicated for 1 h at room temperature in PB with 1% OsO₄, 7% glucose and 0.02 M CaCl₂. After washing in PB, the sections were stained for 30 min with 1% uranyl acetate in 50% ethanol at 37 °C, and they were then dehydrated and flat embedded in Araldite (DeFelipe and Fairen 1993). Embedded sections were glued onto blank Araldite stubs and trimmed. To select the exact location of the samples, we first obtained plastic semithin sections (1–2 µm thick) from the block surface and stained them with toluidine blue to identify cortical layers. These sections were then photographed with a light microscope. The last of these light microscope images (corresponding to the section immediately adjacent to the block face) was then collated with SEM photographs of the surface of the block. In this way, it was possible to accurately identify the regions of the neuropil to be studied.

All animals were handled in accordance with the guidelines for animal research set out in the European

Community Directive 2010/63/EU, and all procedures were approved by the local ethics committee of the Spanish National Research Council (CSIC).

Three-dimensional electron microscopy

Three-dimensional brain tissue samples of the somatosensory cortex (hindlimb representation) were obtained using combined focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB/SEM). We focused on the neuropil, which is composed of axons, dendrites and glial processes, so the samples did not contain cell somata, proximal dendrites in the immediate vicinity of the soma, or blood vessels.

We used a Neon40 EsB electron microscope (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany). This instrument combines a high-resolution field emission SEM column with a focused gallium ion beam, which can mill the sample surface, removing thin layers of material on a nanometer scale. After removing each slice (20 nm thick), the milling process was paused, and the freshly exposed surface was imaged with a 1.8-kV acceleration potential using the in-column energy selective backscattered (EsB) electron detector. The milling and imaging processes were sequentially repeated, and long series of images were acquired through a fully automated procedure, thus obtaining a stack of images that represented a three-dimensional sample of the tissue (Merchan-Perez et al. 2009). Twenty nine different samples (stacks of images) of the neuropil of the six layers of the somatosensory cortex were obtained (three samples of layer I, four of layer II, ten of layer III, five of layer IV, three of layer V and four of layer VI (see Supplementary Table 1 in Online Resource 1). Most of these image stacks have been used previously for the study of the spatial distribution of synapses. In these previous studies, we estimated the global density of synapses in the neuropil using twenty five image stacks of the six layers of the rat somatosensory cortex (Anton-Sanchez et al. 2014; Merchan-Perez et al. 2014). In the present work, we have added four more image stacks (one for layer I, one for layer II, two for layer IV) and we have studied in detail the densities of asymmetric and symmetric synaptic junctions. To estimate the density of synapses in each stack, we counted the number of synaptic junctions within an unbiased three-dimensional counting frame of known volume (Howard and Reed 2005). Image resolution in the xy plane ranged from 3.7 to 4.5 nm/pixel. Resolution in the z axis (section thickness) was 20 nm and image sizes were 2048 × 1536 pixels. Better resolutions can be achieved but it must be considered that, for example, doubling the resolution would result in a field of view that is one-fourth of the original surface. Therefore, we chose these resolution parameters as a compromise between the

resolution and the field of view that still allowed us to identify different types of synapses. The number of sections per stack ranged from 189 to 363 (mean 254.66; total 7385 sections). The volumes of the stacks, after correction for tissue shrinkage (Merchan-Perez et al. 2009), ranged from 225.13 to 508.96 μm^3 (mean 306.55 μm^3 ; total 8889.82 μm^3). The volumes of the counting frames ranged from 123.81 to 280.09 μm^3 (mean = 181.62 μm^3 ; total 5266.88 μm^3) (see Supplementary Table 1 in Online Resource 1).

Identification of synapses and their postsynaptic targets

Synaptic junctions within these volumes were visualized and segmented in 3D with Espina software (Morales et al. 2011). The segmentation algorithm makes use of the fact that presynaptic and postsynaptic densities appear as dark, electron-dense structures under the electron microscope. It requires a Gaussian blur filter preprocessing step to eliminate noisy pixels followed by a gray-level threshold to extract all the voxels that fit the gray levels of the synaptic junction. In this way, the resulting 3D segmentation includes both the pre- and post-synaptic densities (Morales et al. 2013). As previously described, synaptic junctions with a prominent or thin PSD were classified as asymmetric or symmetric synaptic junctions, respectively (Merchan-Perez et al. 2009). To facilitate this task, especially when synaptic junctions were cut obliquely or “en face”, the stacks of serial images were digitally resliced through orthogonal planes of section, so the synaptic junctions could be visualized from different perspectives, as previously described (Merchan-Perez et al. 2009; Morales et al. 2011). To identify the postsynaptic targets of these synapses, we navigated the image stack to determine whether the postsynaptic element was a spine or a dendritic shaft as shown in the video (Online Resource 2). Unambiguous identification of spines requires that the spine must be visually traced to the parent dendrite. Similarly, unambiguous identification of dendritic shafts, especially if they are thin, requires that they can be visually followed inside the stack over a long enough path. Accordingly, when the postsynaptic element of a synapse was close to the margins and it was truncated by the borders of the stack, the identity of the postsynaptic target could not be determined. Therefore, the targets of synapses in any of the stacks were classified into two main categories: spines and dendritic shafts, while truncated elements that could not be safely identified were labeled as “truncated”. When the postsynaptic target was a spine, we further recorded the position of the synapse on the head or neck. We also recorded the presence of single or multiple synapses on a single spine.

We also determined whether the target dendrite was a spiny dendrite or a non-spiny one. If a given dendrite had spines, it was considered as belonging to a pyramidal neuron, except in layer IV where spines may belong to pyramidal cells, spiny stellate cells or other types of spiny non-pyramidal cells. However, if a dendritic segment did not have spines, it was classified as “not determined”, since it could either belong to a non-spiny neuron (most probably an interneuron) or to a dendritic segment from a spiny neuron that does not have spines in the volume of tissue examined.

Statistical analysis

To study whether there were significant differences between synaptic distributions among the different layers, we performed a multiple mean comparison test on the 29 samples of the six cortical layers. Since the necessary assumptions for ANOVA were not satisfied (the normality and homoscedasticity criteria were not met), we used the Kruskal–Wallis test (KW) and the Mann–Whitney test (MW) for pair-wise comparisons. χ^2 tests were used for contingency tables.

Results

Distribution of synapses on spines and shafts

In our samples, we identified a total number of 7567 synaptic junctions in all cortical layers. Of these, we discarded 1383 (18.28%) because the structures onto which synapses were established were truncated by the margins of the stack so it was not possible to identify with certainty if these postsynaptic structures were dendritic spines or dendritic shafts. Thus, we finally analyzed 6184 synapses whose targets were unambiguously identified as spines or dendritic shafts (Fig. 1; see also Video in Online Resource 2). The proportion of AS in our samples ranged from 87.29% in layer IV to 94.11% in layer II (mean 90.28%). Thus, for SS, the proportions ranged from 12.71% in layer IV to 5.89% in layer II (mean 9.72%) (Table 1; Fig. 2a). Although the proportions of AS and SS varied between layers, differences were not significant (KW, $p = 0.05$). No differences were found either when we compared supragranular layers (considering layers I, II and III together) with granular and infragranular layers (layers IV, V and VI considered together) (KW, $p = 0.08$).

Analysis of the preferred target showed that the proportion of synapses established on spines ranged from 74.36% in layer VI to 86.57% in layer II (mean 78.20%). The remaining synapses (mean 21.80%) were established on dendritic shafts. For AS, the proportion of synapses established on spines ranged from 79.80% in layer VI to

Fig. 1 Serial images obtained with combined focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB/SEM). In this example, 275 serial images were taken at a resolution of 5 nm/pixel in the X and Y axes, and a milling depth (section thickness) of 20 nm. **a** Low magnification image of section nr. 127 where numerous synaptic junctions can be identified. Two of these synapses have been selected as examples (black arrows) of asymmetric (AS) and symmetric (SS) synapses. AS had a prominent postsynaptic density, while SS showed a thin postsynaptic density, very similar to the presynaptic density. Note that these classifications were not based on single images but on the examination of the full sequence of images where each synapse was visible (numbers in the top-right corner of each frame correspond to section number). For example, AS is not yet visible in **(b)** (white arrow), but it can be visualized in **(c–f)** (black arrows), until it disappears again in **(g)** (white arrow). Similarly, SS is not yet visible in **(h)** (white arrow), it can be identified in **(i)** to **(l)** (black arrows) and it has disappeared in **(m)** (white arrow). Navigating the stack of serial sections also helps to identify the postsynaptic target of AS as a spine and the postsynaptic target of SS as a dendritic shaft. Ax Axon, Ds dendritic shaft, Sp spine. Scale bar in **(a)** indicates 1 μ m in **(a)** and 556 nm in **(b–m)**

90.56% in layer II (mean 83.61%). The remaining AS (mean 16.40%) were established on dendritic shafts. This contrasts with the distribution of SS; in this case a higher proportion of synapses were found on dendritic shafts (mean 74.53%), ranging from 62.18% in layer IV to 85.88% in layer III. About a quarter of SS were established on spines (25.47%) (Table 1; Figs. 2b, c, 3). We further analyzed the possible differences between cortical layers regarding the proportions of AS and SS synapses and their targets. Statistically significant differences were only found in the distribution of AS on spines and shafts between layers II—where the proportion of AS on spines was the highest—and VI—where the proportion of AS on spines was the lowest, (MW, $p < 0.05$) as shown in Fig. 2b, c. When we focused on the location of axospinous synapses, we found that most of them (97.02%) were located on the spine head, while just 2.98% were located on the neck (Table 1; Fig. 3).

In summary, most synapses in the neuropil were axospinous AS, followed by AS established on dendritic shafts, SS on dendritic shafts and axospinous SS (Table 1; Figs. 2, 3). Given that AS outnumber SS approximately 9:1, and also axospinous synapses outnumber synapses on shafts about 8:2, it could be argued that this distribution could merely arise by chance. To rule out this possibility, 2×2 contingency tables were created showing both types of synapses against the type of their postsynaptic target in each cortical layer (Table 2 and Supplementary Table 2 in Online Resource 1). In these tables, the expected counts of AS and SS on spines and shafts are calculated from the marginal totals, assuming the null hypothesis that there is no association between the type of synapse and the type of postsynaptic target. In other words, the null hypothesis assumes that AS and SS have no preference for spines or shafts. In general, for any contingency table, the expected

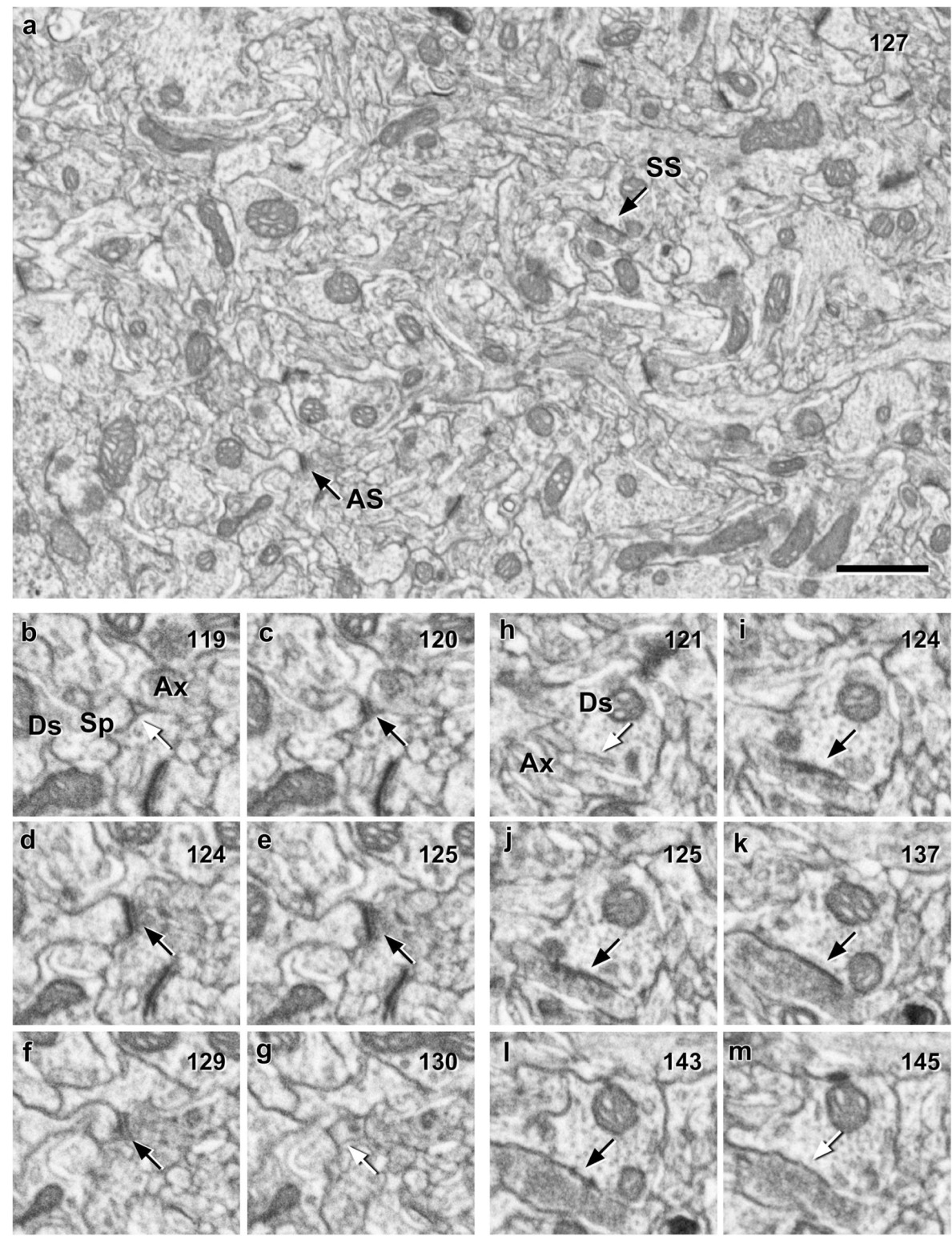


Table 1 Distribution of asymmetric (AS) and symmetric synapses (SS) on spines and dendritic shafts

	Layer						Average (I–VI)
	I	II	III	IV	V	VI	
AS on dendritic spine heads	70.95 (425)	84.09 (814)	76.51 (1671)	69.93 (858)	72.71 (477)	69.27 (381)	73.91%
AS on dendritic spine necks	1.17 (7)	1.14 (11)	1.97 (43)	2.20 (27)	1.52 (10)	1.82 (10)	1.64%
AS on dendritic shafts	15.36 (92)	8.88 (86)	13.74 (300)	15.16 (186)	17.23 (113)	18.00 (99)	14.73%
SS on dendritic spine heads	2.50 (15)	0.72 (7)	0.82 (18)	4.24 (52)	0.91 (6)	2.55 (14)	1.96%
SS on dendritic spine necks	1.50 (9)	0.62 (6)	0.27 (6)	0.57 (7)	0.46 (3)	0.73 (4)	0.69%
SS on dendritic shafts	8.51 (51)	4.55 (44)	6.68 (146)	7.91 (97)	7.16 (47)	7.64 (42)	7.08%
Total	100 (599)	100 (968)	100 (2184)	100 (1227)	100 (656)	100 (550)	

Synapses on spines have been sub-divided into those that are established on spine heads and those established on spine necks. Data are given in percentages (bold typeface) and absolute numbers of synapses studied (parentheses) for each of the six cortical layers (I–VI). Average values as a percentage for all layers are given in the column on the right

frequency for a cell in the i th row and the j th column is $E_{ij} = T_i T_j / T$ where T_i is the marginal total for the i th row, T_j is the marginal total for the j th column, and T is the total number of observations. χ^2 tests of association were applied to these tables. Results indicated that the null hypothesis—the type of synapse is not associated to the type of postsynaptic target—must be rejected in all cases ($p < 0.0001$). Indeed, if SS were distributed at random between spines and shafts they would be more frequent on spines than on shafts, but the opposite occurs. For example, in layer II the expected number of SS established on dendritic shafts under the null hypothesis would be 7.65 ($57 \times 130/968$, see Table 2). However, the actual count is 44, that is, 5.75 times higher than expected. In fact, the proportion of SS established on dendritic shafts was always much higher than expected by chance (from 2.70 times higher in layer IV to 5.75 times higher in layer II; see Table 2 and Supplementary Table 2 in Online Resource 1). This suggests that SS do have a preference for dendritic shafts, but no assumption is made about the possible underlying mechanisms. Finally, the proportion of AS that established axospinous synapses was only 1.05–1.08 times higher than what would be expected by chance (Table 2 and Supplementary Table 2 in Online Resource 1).

Distribution of synapses on dendritic shafts of spiny and aspiny dendritic segments

As stated above, 21.80% of synapses were established on dendritic shafts. We were further interested in knowing

whether dendritic shafts that established synapses belonged to spiny neurons (mainly pyramidal and spiny stellate cells) or to aspiny neurons (mainly interneurons). Thus, once a synapse is identified on a dendritic shaft we need to follow the dendritic segment to ascertain whether it has spines. If spines are found, we can conclude that it belongs to a spiny neuron. However, if we do not find spines, we cannot conclude that it belongs to an aspiny neuron, since it could simply belong to a dendritic segment of a spiny neuron that does not have any spines within the volume of neuropil studied. We found that at least 58.98% of synapses on shafts (12.86% of all synapses) belonged to spiny dendrites. The percentage of synapses established on shafts of spiny dendrites was slightly higher for AS (59.93%) than for SS (56.90%), although this difference was not statistically significant (χ^2 test, $p = 0.30$). In the remaining 41.02% of the synapses that were established on shafts (8.94% of all synapses), the dendritic segments did not have any spine in the volume of tissue studied. We must consider, as mentioned above, that this population of apparently smooth dendrites may contain some unnoticed spiny dendrites. Therefore, given that 78.20% of synapses are axospinous and 12.86% are established on spiny shafts, we can conclude that *at least* 91.06% of synapses are established on spiny neurons. The exact percentage of synapses that are established on truly aspiny neurons cannot be unambiguously determined with our present methodology, but in any case it would be equal to or lower than 8.94%.

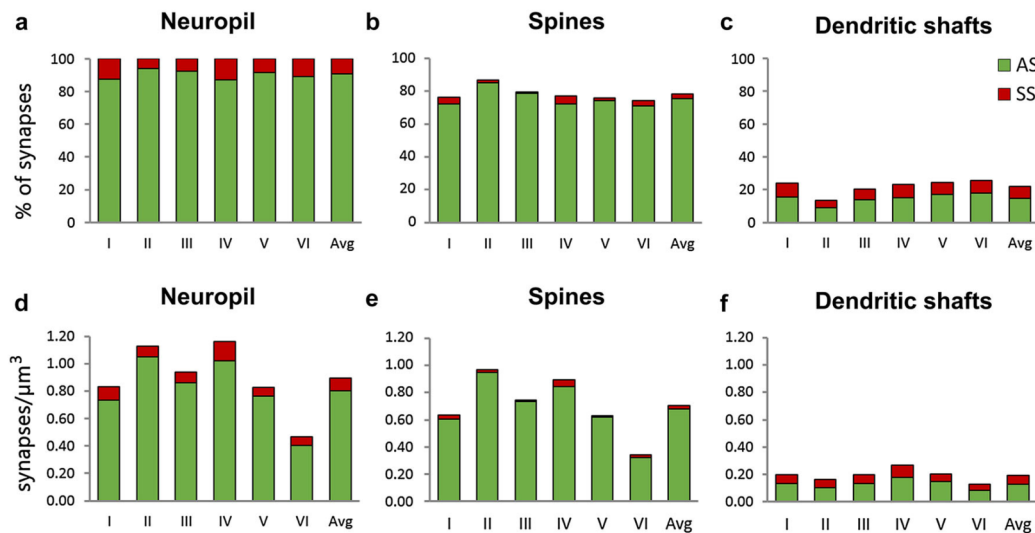


Fig. 2 Proportions of asymmetric (AS) and symmetric (SS) synapses in the neuropil and their distribution on spines and dendritic shafts. **a** Percentage of AS (green) and SS (red) in the neuropil of the six cortical layers and as an average (Avg). The percentages of AS and SS on spines and dendritic shafts are shown in **(b)** and **(c)**, respectively. AS on spines predominate in all layers, followed by AS on dendritic shafts, SS on dendritic shafts and SS on spines. Statistically significant differences were only found between AS on

spines of layers II and VI (MW, $p < 0.05$). **d** Density of AS (green) and SS (red) in the neuropil of the six layers of the cortex and as an average (Avg), measured as the number of synaptic junctions per μm^3 . The densities of AS and SS on spines and dendritic shafts are shown in **(e)** and **(f)**, respectively. A significantly lower density of synapses was found in layer VI for both AS and SS (MW, $p < 0.05$). (See also Table 1)

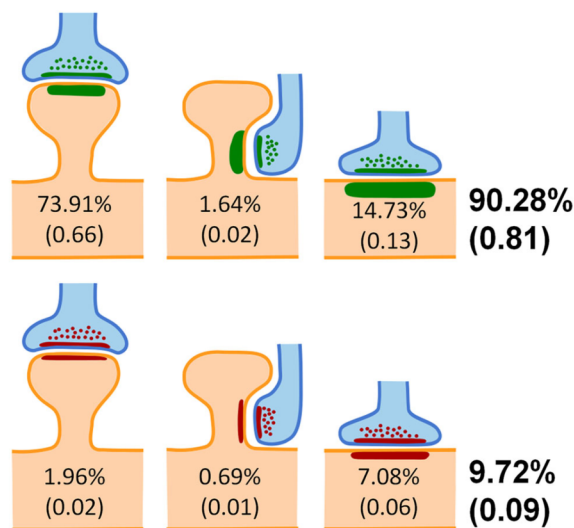


Fig. 3 Schematic representation of the distribution of asymmetric synapses (green) and symmetric synapses (red) on spines and dendritic shafts. Synapses on spines have been sub-classified into those that are established on the head of the spine and those that are established on the neck. Percentages represent the average of the six cortical layers. Values between parentheses represent the density of each type of synapse in the neuropil, in synapses per μm^3

Density of AS and SS on spines and dendritic shafts

To estimate the density of synapses in each stack of images, we counted the number of synaptic junctions within an unbiased three-dimensional counting frame of known volume (see Methods). Total synaptic densities (AS+SS) and densities of AS were highest in layers II and IV and reached their lowest value in layer VI (Fig. 2d; Table 3). Pair-wise tests confirmed that the total density of synapses and the density of AS were lower in the neuropil of layer VI than in layers II and IV (MW, $p < 0.05$). Regarding SS, their density was highest in layer IV and again lowest in layer VI; differences between layer IV and layer VI were statistically significant (MW, $p < 0.05$) (Fig. 2d; Table 3).

We have calculated the densities of AS and SS on spines and shafts from the unbiased estimates of the densities of AS and SS in the different layers and from the proportions of synapses established on spines and dendritic shafts (Fig. 2e, f; Table 3). The density of AS on spines was highest in layer II and IV and lowest in layer VI (MW, $p < 0.05$). The density of AS located on shafts was higher in layer IV compared to layer II and VI (MW, $p < 0.05$). Regarding SS on spines, the highest density was found in layer IV and the lowest was found in layers III and V (MW,

Table 2 Two examples of contingency tables showing the type of synapse against the type of postsynaptic target in cortical layers II and IV

Layer II		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	825 (788.65)	86 (122.35)	911
	SS	13 (49.35)	44 (7.65)	57
	Totals	838	130	968
Layer IV		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	885 (823.98)	186 (247.02)	1071
	SS	59 (120.02)	97 (35.98)	156
	Totals	944	283	1227

The observed counts of synapses in each subcategory were taken from Table 1 and are shown in bold. The expected counts (in parentheses) are calculated from the marginal totals, assuming the null hypothesis that there is no association between the type of synapse and the type of postsynaptic target (see text for details). χ^2 tests of association were applied to these tables indicating that the null hypothesis must be rejected in all cases ($p < 0.0001$). For example, in layer II the number of SS established on dendritic shafts (44) is 5.75 times higher than would be expected by chance (7.65); in layer IV, the number of SS established on dendritic shafts (97) is 2.70 times higher than would be expected by chance (35.98). See the rest of the layers in Supplementary Table 2 in Online Resource 1

$p < 0.05$). No differences between layers were found for SS on dendritic shafts (KW, $p = 0.11$).

Spines with multiple synapses

In our sample, 94.43% of the spines established one synapse and the remaining 5.57% established two or three synapses. We found no cases in which there were more than three synapses on the same spine (Table 4).

When spines formed only one synapse, in 98.65% of the cases this was an AS, and only in 1.35% of the spines the synapse was a SS. When multiple synapses occurred on the same spine, in 79.28% of the cases they were AS, while SS accounted for the remaining 20.72%. Spines with two AS were most common (57.48%), followed by spines establishing one AS and one SS (33.07%). Spines with other combinations of AS and SS were much less abundant, representing less than 10% of the total number of spines with multiple synapses (Table 4). From a different perspective, about two-thirds (63.39%) of the total number of spines established more AS than SS, almost a third (33.07%) had the same number of AS as SS, while spines

with more SS than AS were scarce (3.54%). The proportion of spines with multiple synapses did not vary across layers (KW, $p = 0.95$).

Regarding the location of synapses on the head or neck of the spine, when spines formed only one synapse, in the vast majority of cases (97.54%), it was an AS located on the head of the spine. In 1.09% of the cases, it was an AS located on the neck, 1.14% corresponded to SS on the head and just 0.23% were SS located on the neck. When considering spines with multiple synapses, there were different combinations of synapses on the head and neck (Fig. 4) and the presence of synapses on the spine neck was much more common. In fact, the proportion of AS on the neck rose to 11.85% (that is, about ten times higher than in spines with single synapses), and the proportion of SS on the neck rose to 5.22% (about 25 times higher than in single synapses).

Discussion

We have obtained accurate estimations of the proportions of AS and SS and their preferred dendritic targets in the neuropil of each cortical layer, based on a sample of more than 6100 synapses that have been segmented and visualized in three dimensions. The main findings are fivefold. First, AS outnumber SS approximately 9:1 and axospinous synapses outnumber synapses on shafts approximately 8:2. Second, most synapses in the neuropil are axospinous AS (75.54%), followed by AS established on dendritic shafts (14.73%), SS on dendritic shafts (7.08%) and axospinous SS (2.65%). Third, more than 90% of synapses are established on spiny dendrites. Fourth, both AS and SS are more numerous in layer IV and less numerous in layer VI, whereas no significant differences are found between the remaining layers. Fifth, less than 6% of spines establish more than one synapse.

Sources of synapses

The source of the vast majority of excitatory axon terminals are pyramidal cells, and spines are the main postsynaptic targets of these terminals. There seem to be subpopulations of pyramidal cells whose local axonal arborization selectively form higher proportions of synapses on spines or dendritic shafts. For example, in the cat visual cortex, pyramidal cells in layers II/III and V predominantly established synapses on spines, while layer VI pyramidal cells that project to layer IV mainly established synapses on the shafts (Kisvarday et al. 1986; Somogyi et al. 1998). In our study, we found that the proportion of AS established on spines does not vary across layers—it ranges from approximately 80–90%, which is in line with previous findings in the rat visual cortex (Larkman 1991).

Table 3 Densities of synapses in the neuropil

	Layer						
	I	II	III	IV	V	VI	Avg
Density of all synapses (AS+SS)	0.83	1.13	0.94	1.16	0.83	0.47	0.89
Percent synapses on spines	76.13	86.57	79.58	76.94	75.61	74.36	78.20
Percent synapses on shafts	23.87	13.43	20.42	23.06	24.39	25.64	21.80
Density of synapses on spines	0.63	0.98	0.75	0.89	0.63	0.35	0.70
Density of synapses on dendritic shafts	0.20	0.15	0.19	0.27	0.20	0.12	0.19
Density of AS synapses	0.73	1.05	0.86	1.02	0.76	0.40	0.81
Percent AS on spines	82.44	90.56	85.10	82.63	81.17	79.80	83.62
Percent AS on shafts	17.56	9.44	14.90	17.37	18.83	20.20	16.38
Density of AS on spines	0.61	0.95	0.73	0.84	0.62	0.32	0.68
Density of AS on dendritic shafts	0.13	0.10	0.13	0.18	0.14	0.08	0.13
Density of SS synapses	0.10	0.08	0.08	0.14	0.07	0.06	0.09
Percent SS on spines	32.00	22.81	14.12	37.82	16.07	30.00	25.47
Percent SS on shafts	68.00	77.19	85.88	62.18	83.93	70.00	74.53
Density of SS on spines	0.03	0.02	0.01	0.05	0.01	0.02	0.02
Density of SS on dendritic shafts	0.07	0.06	0.07	0.09	0.06	0.04	0.06

Density of synapses (as no. of synapses/ μm^3) and percentage of asymmetric (AS) and symmetric synapses (SS) on spines and dendritic shafts in the neuropil of the six cortical layers (I–VI). Average values (Avg) are given in the column on the right. See also Supplementary Table 1 in Online Resource 1

Table 4 Spines establishing single and multiple synapses

	Count	%
Spines with a single synapse	4304	94.43
One AS	4246	98.65
One SS	58	1.35
Spines with multiple synapses	254	5.57
Two AS	146	57.48
One AS and one SS	84	33.07
Two AS and one SS	9	3.54
Three AS	6	2.36
Two SS	6	2.36
Three SS	2	0.79
One AS and two SS	1	0.39

94.43% of the total population of spines studied established a single synapse. The remaining 5.57% established multiple synapses. For the latter population, the percentages of the different combinations of multiple synapses are also detailed. AS—asymmetric synapse; SS—symmetric synapse

However, both the local axon collaterals of the pyramidal cells located within a given region and the axons of pyramidal cells located in other cortical areas (corticocortical connections) contribute to this synaptic population. Since the pattern of corticocortical connectivity (i.e., target cortical areas and layers, and density of axon terminals) varies depending on the species, cortical area and layers under consideration (see (Felleman and Van Essen 1991; Markov et al. 2011) for reviews), the proportion of synapses

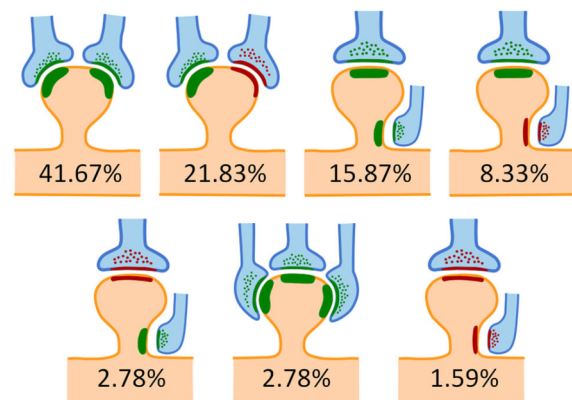


Fig. 4 Schematic representation of the different locations of multiple synapses on the head and neck of spines. Asymmetric synapses have been represented in green and symmetric synapses in red. Percentages indicate the relative frequency of each case with respect to the total number of spines establishing multiple synapses. Other combinations were rarely found (about 5% of all cases) and have not been represented

originating from local or distant pyramidal cell axons should be examined in particular cortical areas and species.

Another major source of AS are thalamocortical afferent fibers and spines are also the main target. The majority of pyramidal cells have significant parts of their dendritic fields in the layers where thalamocortical axons terminate, but there is great variability in the number and proportion of thalamic synapses that different pyramidal cells receive.

For example, White and Keller 1989 have shown that in the mouse somatosensory cortex, pyramidal cells projecting to ipsilateral cortical areas, to the thalamus and to the striatum display a characteristic proportion of their layer IV dendritic synapses from thalamocortical axon terminals: corticothalamic cells receive the greatest number of thalamocortical synapses ($13.21 \pm 5.06\%$ of all axospinous synapses), corticocortical cells receive the next highest number ($4.02 \pm 2.14\%$), and corticostriatal the least ($0.55 \pm 0.15\%$). Thus, further studies are needed to determine the different proportions of synapses on spines and dendritic shafts in relation to the local, cortical or subcortical origin of the parent axons in the rat somatosensory cortex.

Regarding the origin of SS, the axons of GABAergic interneurons are the major source, and different types of GABAergic neurons form synapses preferentially with particular regions of pyramidal cells or with other interneurons (DeFelipe and Fariñas 1992; Freund and Buzsáki 1996; Houser et al. 1984; Jones 1993; Somogyi et al. 1998). Therefore, not all interneurons contribute equally to the SS found in the neuropil. Several types of interneurons, including Martinotti cells, basket cells and double bouquet cells target spines of pyramidal cells (e.g., (DeFelipe et al. 1990; DeFelipe et al. 1989; Kawaguchi and Kubota 1998; Kisvarday et al. 1985; Somogyi and Cowey 1981; Wang et al. 2004). Therefore, although the proportion of SS synapses on spines is relatively low, they represent an important component of the GABAergic synaptic circuits (Kubota et al. 2015). Finally, the spines establishing SS are likely to be strategically located in the dendritic arbor of the pyramidal cells. For example, Kubota et al. 2007 found that a large proportion of axons forming SS were on spines that were also innervated by thalamocortical axons. Furthermore, double bouquet cells do not appear to form axospinous synapses with apical dendrites, but with basal dendrites and oblique branches of the apical dendrites (DeFelipe et al. 1989, 1990; Somogyi and Cowey 1981), whereas certain types of basket cells (Kisvarday et al. 1987; Somogyi et al. 1983) form numerous synapses with apical dendrites.

Proportion of AS and SS

The ratio of AS to SS that we found in the neuropil of the somatosensory cortex of the rat at P14 is similar to previous findings in other species and cortical regions using transmission electron microscopy, in which a percentage of asymmetric and symmetric synapses between 80–95% and 5–20%, respectively were reported (Beaulieu and Colonnier 1985; Braitenberg and Schüz 1998; DeFelipe 2011; DeFelipe and Fariñas 1992; Micheva and Beaulieu 1996; Schüz and Palm 1989). Furthermore, we have not found any statistically significant differences

in the proportions of AS and SS in different cortical layers, or between supragranular and infragranular layers. In our samples, the highest proportion of SS was found in layer IV. This is in line with data described by Micheva and Beaulieu 1996 who showed that, from P15 onwards, layer IV of the rat barrel field cortex has a higher percentage of SS than the rest of the layers. However, the differences we have found in the somatosensory cortex are small between layers IV, I and VI, and they were not significant in any of the cases. Thus, it seems clear that there are proportionally more excitatory synapses than inhibitory synapses in all cortical layers and areas. The functional significance of this synaptic organization remains to be elucidated.

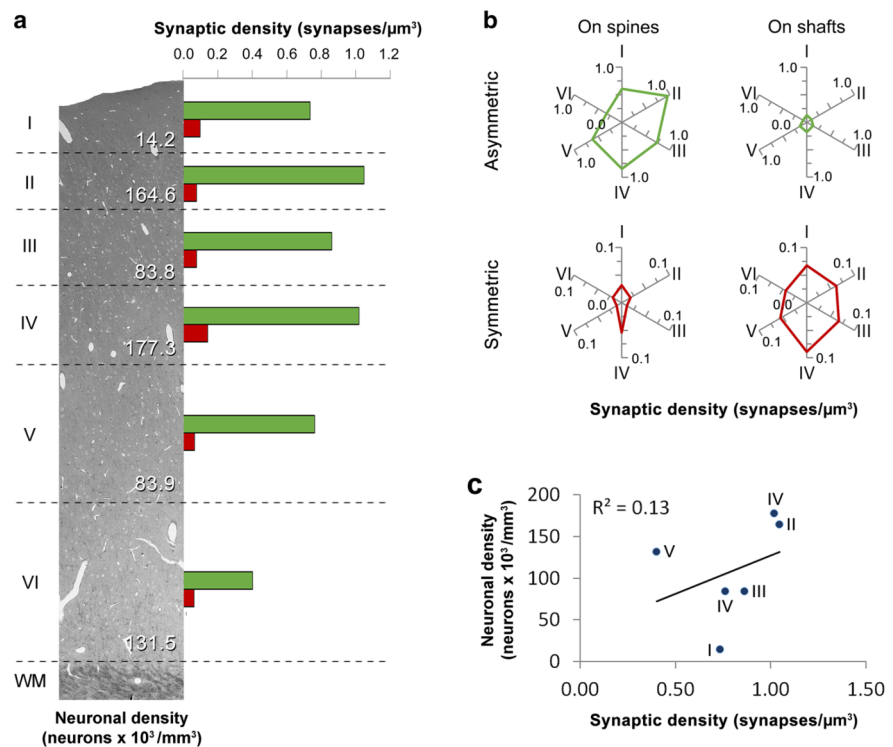
Density of synapses

Densities of synapses vary across layers, with layers II and IV being the ones with the highest densities. Interestingly, layers II and IV are the layers with the highest density of neurons (Fig. 5); (Markram et al. 2015). However, in layer I, the density of synapses is relatively high but the density of neurons is low, whereas in layer VI the density of synapses is the lowest but the density of neurons is higher than in layers I, III and V. Thus, there does not seem to be a relationship between the density of neurons and the density of synapses. When studying the location of these synapses, we found that there are more AS synapses located on spines in layers II and IV when compared to layer VI, but AS located on dendritic shafts are denser only in layer IV, with layer II and VI having the lowest densities. Therefore, layer II has the highest density of AS synapses located on spines and the lowest located on shafts. When considering SS synapses located on spines, layer IV has the highest density when compared to layers II and V, and there are no differences in the density of SS on shafts across layers.

Postsynaptic targets

The proportions of postsynaptic targets of synapses in the neuropil have been previously described in the visual cortex of the adult cat (Beaulieu and Colonnier 1985). This study showed that of all synapses, 66.4% were AS located on spines, 17.6% were AS located on dendritic shafts, 5.3% were SS located on spines and 10.6% were SS located on shafts. A study on the distribution of synapses in the rat barrel cortex showed that, at the age of P15, AS are mainly located on spines (82%), followed by dendritic shafts (17%), with less than 1% of the AS on somas (Micheva and Beaulieu 1996). Regarding SS, they are mainly located on dendritic shafts (54%), followed by spines (39%), with just 8% located on the soma. They also reported that, at this age, 15% of the synapses are SS. In the present study, we have found in the rat at P14 that in the neuropil 75.85% of the synapses are AS located on spines, 14.73% are AS

Fig. 5 Schematic summary of the results. **a** Neuronal and synaptic densities in the six layers of the somatosensory cortex. The image of the cerebral cortex was taken using the secondary electron imaging mode of the scanning electron microscope. Synaptic densities of AS are represented as *green bars* and SS as *red bars*. WM—white matter. The neuronal density data have been taken from (Markram et al. 2015) **b** synaptic densities of AS (*green*) and SS (*red*) on spines and dendritic shafts in the six layers of the cortex. **c** There is no relation between the density of neurons and the density of synapses across layers ($R^2 = 0.13$)



located on dendritic shafts, 2.65% are SS located on spines and 7.08% are SS located on shafts. Therefore, in all cases, axospinous AS predominate followed by AS established on dendritic shafts, SS on dendritic shafts and axospinous SS. The different percentages may be due to the different species, cortical areas and ages used (e.g., see (DeFelipe 2011; DeFelipe et al. 1999)). It is clear that the preferred targets of AS are spines, and the preferred target of SS are dendritic shafts. Moreover, our statistical analysis indicates that the proportion of SS on dendritic shafts is about 2.70–5.75 times higher than the proportion that would be expected if they were distributed at random between spines and shafts, whereas the proportion of AS that established axospinous synapses was only 1.05–1.08 times higher than would be expected by chance (See Table 2 and Supplementary Table 2 in Online Resource 1). This kind of analysis is based on 2×2 contingency tables showing the number of AS and SS against their postsynaptic targets (spines and shafts) and, as such, it does not make any assumption about the possible underlying mechanisms.

Number of synapses per spine

Classical descriptions of synapses state that one spine establishes one synapse; however, some spines can have multiple synapses (Jones and Powell 1969; Popov et al.

2005). Recently, it has been proposed that there is a link between long-term memory and the formation of multiple synapses when functional strengthening of existing synapses is impaired (Giese et al. 2015; Radwanska et al. 2011). Here, we show that around 6% of spines have two or more synapses, which is a higher proportion than has been reported in previous studies in the hippocampus and neocortex (less than 1%) (Bosch et al. 2015; Petrak et al. 2005; Radwanska et al. 2011). The proportion of multiple synapses on the same spine does not vary across layers. As described above, when spines establish only one synapse, this is excitatory in more than 98% of cases; inhibitory synapses are very rare. However, when spines form multiple synapses, the ratio of AS to SS is approximately 8:2. Therefore, inhibitory synapses on spines occur more frequently when multiple synapses are established. Synapses on the neck of the spine also occur more frequently when multiple synapses are established on the same spine. This could be due to the lack of space on the head of the spine to form multiple synapses, but other molecular and functional factors may be involved, since the proportion of SS and AS on the neck are different. In fact, the proportion of SS and AS on the neck of the spine is about 25 and 10 times higher in spines with multiple synapses, respectively, when compared with single-synapse spines.

In the present study, we have not addressed the issue of the proportion of spines that lack synapses. Rather, we have identified synaptic junctions and then identified the postsynaptic elements. Therefore, no structure lacking synapses has been included in our analysis. Previous studies in the adult mouse neocortex have shown that the proportion of non-synaptic spines is below 4% (Arellano et al. 2007); see also (Bosch et al. 2015; Petrak et al. 2005; Radwanska et al. 2011), but further research is necessary to ascertain whether this low proportion is similar in the juvenile somatosensory cortex.

Synapses on spiny and smooth dendrites

Most synapses are established in the neuropil (Alonso-Nanclares et al. 2008), which is composed of axons, dendrites and glial processes. The dendritic processes of the neuropil can be spiny or aspiny. In all layers, except layer IV, the origin of spiny dendrites are pyramidal cells—although the dendrites of some GABAergic interneurons are sparsely spiny, there is only a small population of these dendrites in the neuropil. Layer IV includes a mixed population of spiny cell types: layer IV pyramids, star pyramids and spiny stellates. Since pyramidal cells are the most abundant type of cortical neuron (estimated at 70–80% of the total population), it can be assumed that spiny dendrites are the most common type of dendrite in the neuropil. This has been confirmed recently in the 1500 μm^3 of cortical tissue reconstructed by Kasthuri et al. (2015) who found that 92% of the dendrites were spiny. In general, aspiny dendrites originate from GABAergic interneurons. However, the proximal portion of apical and basal dendrites of pyramidal neurons does not contain spines; reviewed in (DeFelipe 2015). Despite the fact that, in the present study, the sampling of the neuropil was carried out at a distance from the somata of pyramidal cells, we cannot rule out the possibility that some aspiny dendrites correspond to proximal dendrites of adjacent pyramidal cells (stacks containing blood vessels, cell somata or main shafts of apical and basal dendrites in the immediate vicinity of the soma were not used in this study).

In the present study, it is clear that most synapses are established on spiny neurons not only because the vast majority of synapses (78.20%) are established on spines, but also because synapses established on the shafts of spiny dendrites (12.86% of all synapses) outnumber synapses established on aspiny dendritic segments (8.94% of all synapses). Thus, we can conclude that the percentage of synapses on spiny dendrites is at least 91.06%.

In summary, this study provides a large quantitative electron microscopic dataset that will contribute not only to the knowledge of the cortical ultrastructure, but also

towards defining the connectivity patterns through all layers of the juvenile somatosensory cortex.

Acknowledgements We thank A. I. Garcia for technical assistance. This work was supported by grants from the following entities: the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grants SAF 2015-66603-P and the Cajal Blue Brain Project, Spanish partner of the Blue Brain Project initiative from EPFL); the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 604102 (Human Brain Project); the European Union Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 720270 (Human Brain Project); and Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, CB06/05/0066, Spain).

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, DeFelipe J (2008) Gender differences in human cortical synaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14615–14619
- Anton-Sanchez L, Bielza C, Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Larranaga P (2014) Three-dimensional distribution of cortical synapses: a replicated point pattern-based analysis. *Front Neuroanat* 8:85
- Arellano JJ, Espinosa A, Fairen A, Yuste R, DeFelipe J (2007) Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* 145:464–469
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R et al (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557–568
- Beaulieu C, Colonnier M (1985) A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *J Comp Neurol* 231:180–189
- Beaulieu C, Somogyi P (1990) Targets and quantitative distribution of GABAergic synapses in the visual cortex of the cat. *The European journal of neuroscience* 2:896
- Bosch C, Martínez A, Masachs N, Teixeira CM, Feraud I et al (2015) FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front Neuroanat* 9:60
- Braitenberg V, Schüz A (1998) *Cortex: statistics and geometry of neuronal connectivity*. Springer, New York, p 272
- Colonnier M (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9:268–287
- DeFelipe J (2011) The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5:29
- DeFelipe J (2015a) The anatomical problem posed by brain complexity and size: a potential solution. *Front Neuroanat* 9:104
- DeFelipe J (2015b) The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat* 9:14
- DeFelipe J, Fairen A (1993) A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *J Histochem Cytochem* 41:769–772

- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563–607
- DeFelipe J, Jones EG (1988) A light and electron microscopic study of serotonin-immunoreactive fibers and terminals in the monkey sensory-motor cortex. *Exp Brain Res* 71:171–182
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG (1989) Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. *Brain Res* 503:49–54
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Molinari M, Jones EG (1990) A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience* 37:655–673
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchán-Pérez A (1999) Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. *Cereb Cortex* 9:722–732
- Denk W, Horstmann H (2004) Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol* 2:e329
- Descarries L, Mechawar N (2000) Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. In *progress in brain research*. Elsevier, Amsterdam, pp. 27–47
- Feldman ML (1984) Morphology of the neocortical pyramidal neuron. In *Peters A, Jones EG (ed) Cerebral cortex*, Plenum Press, New York, pp. 123–200
- Felleman DJ, Van Essen DC (1991) Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1:1–47
- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470
- Giese KP, Aziz W, Kraev I, Stewart MG (2015) Generation of multi-innervated dendritic spines as a novel mechanism of long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 124:48–51
- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 93:420–433
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:341–371
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12:2685–2705
- Helmstaedter M (2013) Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction. *Nat Methods* 10:501–507
- Houser CR, Barber RP, Vaughn JE (1984) Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in the dorsal lateral vestibular nucleus: evidence for an intrinsic and extrinsic GABAergic innervation. *Neurosci Lett* 47:213–220
- Howard V, Reed MG (2005) *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, New York
- Jones EG (1993) GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex* 3:361–372
- Jones EG, Powell TPS (1969) Morphological variations in dendritic spines of neocortex. *J Cell Sci* 5:509
- Kasthuri N, Hayworth KJ, Berger DR, Schalek RL, Conchello JA et al (2015) Saturated reconstruction of a volume of neocortex. *Cell* 162:648–661
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1998) Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* 85:677–701
- Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D, Somogyi P (1985) Synaptic connections of intracellularly filled clutch cells: a type of small basket cell in the visual cortex of the cat. *J Comp Neurol* 241:111–137
- Kisvarday ZF, Martin KA, Freund TF, Magloczky Z, Whitteridge D, Somogyi P (1986) Synaptic targets of HRP-filled layer III pyramidal cells in the cat striate cortex. *Exp Brain Res* 64:541–552
- Kisvarday ZF, Martin KA, Friedlander MJ, Somogyi P (1987) Evidence for interlaminar inhibitory circuits in the striate cortex of the cat. *J Comp Neurol* 260:1–19
- Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B (2008) Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci* 28:2959–2964
- Kreshuk A, Straehle CN, Sommer C, Koethe U, Cantoni M et al (2011) Automated detection and segmentation of synaptic contacts in nearly isotropic serial electron microscopy images. *PLoS ONE* 6:e24899
- Kubota Y, Hatada S, Kondo S, Karube F, Kawaguchi Y (2007) Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J Neurosci* 27:1139–1150
- Kubota Y, Kondo S, Nomura M, Hatada S, Yamaguchi N et al (2015) Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *Elife* 4:e07919
- Larkman AU (1991) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions. *J Comp Neurol* 306:332–343
- Markov NT, Misery P, Falchier A, Lamy C, Vezoli J et al (2011) Weight consistency specifies regularities of macaque cortical networks. *Cereb Cortex* 21:1254–1272
- Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M et al (2015) Reconstruction and simulation of neocortical microcircuitry. *Cell* 163:456–492
- Merchan-Perez A, Rodriguez JR, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J (2009) Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat* 3:14
- Merchan-Perez A, Rodriguez JR, Gonzalez S, Robles V, Defelipe J et al (2014) Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study. *Cereb Cortex* 24:1579–1588
- Micheva KD, Beaulieu C (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373:340–354
- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodriguez J-R, Defelipe J, Rodriguez A, Merchan-Perez A (2011) Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front Neuroanat* 5:18
- Morales J, Rodriguez A, Rodriguez JR, DeFelipe J, Merchan-Perez A (2013) Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Front Neuroanat* 7:10
- Morgan JL, Lichtman JW (2013) Why not connectomics? *Nat Methods* 10:494–500
- Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Cambridge
- Petrak LJ, Harris KM, Kirov SA (2005) Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission. *J Comp Neurol* 484:183–190
- Popov VI, Deev AA, Klimenko OA, Kraev IV, Kuz'minykh SB et al (2005) Three-dimensional reconstruction of synapses and dendritic spines in the rat and ground squirrel hippocampus: new structural-functional paradigms for synaptic function. *Neurosci Behav Physiol* 35:333–341
- Radwanska K, Medvedev NI, Pereira GS, Engmann O, Thiede N et al (2011) Mechanism for long-term memory formation when synaptic strengthening is impaired. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18471–18475

- Schüz A, Palm G (1989) Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *J Comp Neurol* 286:442–455
- Silberberg G (2008) Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Curr Opin Neurobiol* 18:332–337
- Smith SJ (2007) Circuit reconstruction tools today. *Curr Opin Neurobiol* 17:601–608
- Somogyi P, Cowey A (1981) Combined Golgi and electron microscopic study on the synapses formed by double bouquet cells in the visual cortex of the cat and monkey. *J Comp Neurol* 195:547–566
- Somogyi P, Kisvarday ZF, Martin KA, Whitteridge D (1983) Synaptic connections of morphologically identified and physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. *Neuroscience* 10:261–294
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113–135
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G et al (2004) Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561:65–90
- White EL (2007) Reflections on the specificity of synaptic connections. *Brain Res Rev* 55:422–429
- White EL, Keller A (1989) Cortical circuits: synaptic organization of the cerebral cortex. Structure, function and theory. Birkhäuser, Boston
- Yuste R (2010) Dendritic spines. MIT, Massachusetts, p 264

Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the juvenile rat somatosensory cortex.

Andrea Santuy, Jose-Rodrigo Rodriguez, Javier DeFelipe, Angel Merchan-Perez

Supplementary Table1

Layer	Sample	Animal	No. of sections	Resolution (nm/pixel)	Total volume (μm^3)	CF volume (μm^3)	No. of AS	No. of SS	No. of all synapses	AS ($\text{syn}/\mu\text{m}^3$)	SS ($\text{syn}/\mu\text{m}^3$)	AS+SS ($\text{syn}/\mu\text{m}^3$)
I	1	w33	267	3.69	312.93	210.62	161	19	180	0.7644	0.0902	0.8546
	2	w35	301	3.72	358.54	177.20	111	17	128	0.6264	0.0959	0.7224
	3	w31	202	3.72	240.61	167.38	136	19	155	0.8125	0.1135	0.9260
II	1	w33	263	3.69	308.24	224.35	211	19	230	0.9405	0.0847	1.0252
	2	w35	189	3.72	225.13	139.51	117	10	127	0.8387	0.0717	0.9103
	3	w35	237	3.72	282.30	149.03	195	11	206	1.3085	0.0738	1.3823
	4	w31	239	3.72	284.68	213.91	239	18	257	1.1173	0.0841	1.2014
III	1	w31	223	3.69	261.36	149.13	135	12	147	0.9053	0.0805	0.9857
	2	w31	210	3.69	246.12	157.15	101	8	109	0.6427	0.0509	0.6936
	3	w33	214	3.69	250.81	186.45	158	15	173	0.8474	0.0805	0.9279
	4	w33	213	3.69	249.64	176.44	157	21	178	0.8898	0.1190	1.0088
	5	w33	324	3.69	379.73	176.28	148	19	167	0.8396	0.1078	0.9474
	6	w33	219	3.69	256.67	175.55	156	9	165	0.8886	0.0513	0.9399
	7	w33	219	3.69	256.67	191.28	171	18	189	0.8940	0.0941	0.9881
	8	w35	363	3.72	432.39	247.58	186	12	198	0.7513	0.0485	0.7997
	9	w35	247	3.72	294.21	178.40	191	10	201	1.0706	0.0561	1.1267
	10	w35	258	3.72	307.32	165.06	152	16	168	0.9209	0.0969	1.0178
IV	1	w33	235	3.69	275.42	154.59	148	24	172	0.9574	0.1552	1.1126
	2	w35	211	3.72	251.33	158.38	190	15	205	1.1996	0.0947	1.2943
	3	w35	224	3.72	266.82	183.65	151	17	168	0.8222	0.0926	0.9148
	4	w35	253	3.72	301.36	140.63	143	35	178	1.0168	0.2489	1.2657
	5	w35	263	3.72	313.27	123.81	144	18	162	1.1631	0.1454	1.3084
V	1	w33	319	3.69	373.87	165.62	108	9	117	0.6521	0.0543	0.7064
	2	w33	282	3.69	330.51	218.01	181	17	198	0.8302	0.0780	0.9082
	3	w33	310	3.69	363.32	207.95	162	13	175	0.7790	0.0625	0.8416
VI	1	w33	253	3.69	296.52	185.32	84	8	92	0.4533	0.0432	0.4964
	2	w35	285	3.72	339.48	183.55	70	15	85	0.3814	0.0817	0.4631
	3	w31	270	3.72	321.61	179.97	88	14	102	0.4890	0.0778	0.5668
	4	w31	292	4.50	508.96	280.09	92	15	107	0.3285	0.0536	0.3820
Totals			Layer I		912.07	555.19	408	55	463	0.7349	0.0991	0.8339
			Layer II		1100.35	726.80	762	58	820	1.0484	0.0798	1.1282
			Layer III		2934.92	1803.32	1555	140	1695	0.8623	0.0776	0.9399
			Layer IV		1408.20	761.07	776	109	885	1.0196	0.1432	1.1628
			Layer V		1067.70	591.58	451	39	490	0.7624	0.0659	0.8283
			Layer VI		1466.57	828.92	334	52	386	0.4029	0.0627	0.4657

Supplementary Table2

Layer I		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	432 (398.9)	92 (125.1)	524
	SS	24 (57.1)	51 (17.9)	75
Totals		456	143	599

Layer II		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	825 (788.65)	86 (122.35)	911
	SS	13 (49.35)	44 (7.65)	57
Totals		838	130	968

Layer III		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	1714 (1602.72)	300 (411.28)	2014
	SS	24 (135.28)	146 (34.72)	170
Totals		1738	446	2184

Layer IV		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	885 (823.98)	186 (247.02)	1071
	SS	59 (120.02)	97 (35.98)	156
Totals		944	283	1227

Layer V		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	487 (453.66)	113 (146.34)	600
	SS	9 (42.34)	47 (13.66)	56
Totals		496	160	656

Layer VI		Type of postsynaptic target		Totals
		Spine	Shaft	
Type of synapse	AS	391 (364.38)	99 (125.62)	490
	SS	18 (44.62)	42 (15.38)	60
Totals		409	141	550

Supplementary Table 1. Densities of asymmetric and symmetric synapses in the six cortical layers.

Cortical layer (I–VI), number of samples per layer and animal ID are indicated in the three leftmost columns. Image acquisition details such as the number of sections per sample and image resolution are shown next. In all cases image sizes were 2048 x 1536 pixels and section thickness was 20 nm. The rest of the columns indicate the total volume of each image stack corrected for tissue shrinkage, the volume of the unbiased counting frame (CF volume), counts of asymmetric (AS) and symmetric (SS) synapses, and density of AS, SS and all synaptic junctions per sample.

Supplementary Table 2. Contingency tables showing the type of synapse against the type of postsynaptic target in all cortical layers. The observed counts of synapses in each subcategory were taken from Table 1 and are shown in bold. The expected counts (in parentheses) are calculated from the marginal totals assuming the null hypothesis that there is no association between the type of synapse and the type of postsynaptic target. Chi-square tests of association were applied to these tables indicating that the null hypothesis must be rejected in all cases ($p < 0.0001$).

**Study of the size and shape of synapses in the juvenile rat somatosensory
cortex with 3D electron microscopy.**
(2017) *Remitido.*

Study of the size and shape of synapses across cortical layers of the juvenile rat somatosensory cortex with 3D electron microscopy

Santuy, A.¹, Rodríguez, J.R.^{1,2}, DeFelipe, J.^{1,2}, Merchán-Pérez, A.^{1,3}

¹ Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid. Pozuelo de Alarcón, 28223, Madrid, Spain.

² Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002, Madrid, Spain.

³ Departamento de Arquitectura y Tecnología de sistemas Informáticos, Universidad Politécnica de Madrid. Boadilla del Monte, 28660, Madrid, Spain.

Abstract

Changes in the surface area of the synaptic active zone and postsynaptic density are thought to have significant functional consequences. We used focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB/SEM) to obtain stacks of serial sections from the six layers of the rat somatosensory cortex. We segmented in three-dimensions a large number of synapses (n=6891) to analyze the size and shape of excitatory (asymmetric) and inhibitory (symmetric) synapses in the neuropil of all cortical layers. We have applied a new method to estimate the size and shape of synapses that involved extracting the synaptic apposition surface with dedicated software. We found that there are significant differences in the size and shape of synaptic junctions between different types of synapses and cortical layers. Given that different cortical layers have distinct connectivity patterns, these variations may be related to synaptic attributes of particular synaptic circuits in each layer.

Introduction

There are two main types of chemical synapses in the cerebral cortex that can be identified at the electron microscope level on the basis of morphological criteria — asymmetric and symmetric synapses. Asymmetric synapses (AS) have a thickened postsynaptic density (PSD) and are generally excitatory (glutamatergic). Symmetric synapses (SS) have a thinner PSD, with a similar thickness to that of the presynaptic density, and are inhibitory (GABAergic) (Ascoli et al 2008, Houser et al 1984, Peters et al 1991). In the cerebral cortex, the vast majority of synapses are established in the neuropil which represents 90-98% of the volume of the gray matter (Alonso-Nanclares et al 2008a) (Alonso-Nanclares et al 2008b). In the neuropil, which is composed of dendrites, axons and glial processes, most cortical synapses are excitatory (80-90%) and originate from spiny neurons and extrinsic cortical afferents. Inhibitory synapses are less numerous (about 10-20%) and mainly originate from local interneurons (Beaulieu & Colonnier 1985, DeFelipe et al 2002, DeFelipe & Fariñas 1992, Feldman 1984, Schüz & Palm 1989, Silberberg 2008, White 2007, White & Keller 1989).

Synapses are dynamic structures that can undergo modifications due to variations in their activity patterns; they are continuously remodeled and replaced as part of the normal maintenance of the brain (for recent reviews see (Fauth & Tetzlaff 2016, Lisman 2017)). This is important because the size of the active zone (AZ) —which is the area of the presynaptic axon where synaptic vesicles are docked before they release the neurotransmitter to the synaptic cleft— is proportional to the number of docked synaptic

vesicles and to the probability of neurotransmitter release (Branco et al 2010, Holderith et al 2012, Matz et al 2010, Schikorski & Stevens 1997). On the postsynaptic side, the PSD area is proportional to the number of postsynaptic receptors (for AMPA receptors see, for example, (Ganeshina et al 2004a, Ganeshina et al 2004b, Kharazia & Weinberg 1999, Nusser et al 1998, Takumi et al 1999, Tarusawa et al 2009)). Thus, changes in the surface areas of the AZ and PSD have significant functional consequences. Accordingly, it is important to measure the size of a synapse in different brain regions and under different experimental conditions. However, this is not an easy task and numerous researchers have used different approaches to overcome this difficulty. The use of the cross-sectional length of the PSDs in multiple single photomicrographs obtained by transmission electron microscopy (TEM) gives a rough estimate of synaptic sizes (DeFelipe et al 1999). Better estimates can be obtained from TEM serial sections. For example, Tarusawa et al (2009) used the maximum width of the PSDs in a series of TEM sections as an estimation of PSD size, while others such as Toni et al (2001) have used the PSD surface area calculated from serial sections. The problem is that serial sectioning is a time-consuming and technically demanding task, mainly due to the difficulties in obtaining large numbers of correlative serial sections. As a consequence, data on the synaptic size is either relatively inaccurate or based on relatively scant data. Recently, new electron microscopy techniques have been developed that allow us to obtain long series of sections in an automated way (Denk & Horstmann 2004, Helmstaedter

could still be clearly identified, in a period of time that allowed us to acquire between 189 and 363 serial sections per stack (mean: 254.66; total: 7385 sections).

Extraction of the Synaptic Apposition Surface

Synaptic junctions within these volumes were visualized and automatically segmented in three dimensions with Espina software (Morales et al., 2011). The segmentation algorithm makes use of the fact that presynaptic and postsynaptic densities appear as dark, electron-dense structures under the electron microscope. It requires a Gaussian blur filter preprocessing step to eliminate noisy pixels, followed by a gray-level threshold to extract all the voxels that fit the gray levels of the synaptic junction. In this way, the resulting 3D segmentation includes both the pre- and postsynaptic densities. Since the pre- and postsynaptic densities are located face to face, their surface areas are very similar (correlation coefficients over 0.97; see (Schikorski & Stevens 1997, Schikorski & Stevens 1999). Thus, they can be simplified to a single surface and represented as the surface of apposition between the pre- and postsynaptic densities. This surface can be extracted from the three-dimensionally segmented synaptic junction (Morales et al 2013). For the sake of clarity, we will refer to this surface as the *synaptic apposition surface* (SAS). Espina was used to visualize the SAS in 3D and the possible presence of perforations or deep indentations in the perimeter were recorded. Espina was also used to measure SAS areas and perimeters. Since the SAS adapts to the curvature of the synaptic junction, we have also measured its curvature as one minus the ratio between the projected area of the SAS and the area of the SAS. This measure would equal 0 in a totally flat SAS, and the value would increase up to a maximum of 1 as the SAS curvature increases. All measurements have been corrected for tissue shrinkage due to processing for electron microscopy (Merchan-Perez et al 2009). Correction factors for volume, surface and linear measurements were 0.73, 0.81 and 0.90, respectively.

Results

Synaptic junction areas and perimeters

In our samples, we found 7569 synaptic junctions. We discarded 678 (8.96%) because they were truncated by the edges of the field of view. Thus, we finally analyzed 6891 synapses whose synaptic junctions were complete, so their SAS could be extracted (Figure 1). Of these, 6259 (90.83%) were AS and 632 were SS (9.17%).

SAS areas ranged from 909.23 to 556393.19 nm² for AS, and from 3388.21 to 631774.04 nm² for SS. Mean SAS areas were smaller for AS than for SS in all cortical layers (Table 1, Figure 2A) and these differences were statistically significant in all cases (MW tests, $p < 0.001$ in layers I to V and $p = 0.026$ in layer VI). For AS, the largest mean SAS areas were found in layer III (mean = 72729.58 nm²) and the differences between this layer and all other layers were statistically significant (MW, $p \leq 0.023$; Supplementary Table 1). The smallest mean SAS areas of AS were found in layer IV (mean = 54770.81 nm²) and the differences between this layer and layers I, III and V were statistically significant (MW, $p \leq 0.001$;

Supplementary Table 1). For SS, the largest mean SAS areas were also found in layer III (mean = 116703.43 nm²; differences were statistically significant between this layer and layers II, IV and VI; MW, $p \leq 0.002$; Supplementary Table 2). The smallest mean SAS areas of SS were found in layer IV (mean = 68355.35 nm²) and the differences were statistically significant between this layer and all other layers except layer VI (MW, $p \leq 0.031$; Supplementary Table 2).

We also measured the perimeters of the SAS (Table 2, Figure 2B). For each individual layer, mean perimeters were always larger for SS than for AS (Figure 2B; Table 2). As expected, there was a strong correlation between SAS area and perimeter ($R^2=0.75$ for all synapses; $R^2=0.75$ for AS; $R^2=0.72$ for SS) (Figure 2C). It is also interesting to note that the larger the SAS area, the more tortuous its perimeter. This can be seen in Figure 2C, which shows that the SAS perimeter tends to grow faster than the perimeter of a circle. A summary of paired layer-by-layer comparisons of SAS areas and perimeters is shown in Supplementary Tables 1 to 4.

To further characterize the size distribution of SAS, we plotted the frequency histograms of SAS areas for each individual layer and for all layers as a whole. For AS, frequency histograms had similar shapes in all layers, with a tail to the right, and they overlapped greatly (Figure 3A). For SS, more irregular-shaped histograms were obtained for individual layers, probably due to the smaller number of synaptic junctions that were analyzed per layer (Figure 3B) (see also Table 1). We then performed goodness-of-fit tests to find the theoretical probability density functions that best fitted the empirical distributions of SAS areas in each layer and in all layers pooled together. We found that the best fit corresponded to log-normal distributions in all cases (Table 1 and Figure 3). These log-normal distributions, with some variations in the location (μ) and scale (σ) parameters (Table 1), were found in all layers for both AS and SS, although the fit was better for AS than for SS, probably due to the smaller number of SS analyzed (Figure 3; Supplementary Figures 1 and 2). The best-fit probability density functions for SAS perimeters were also log-normal distributions (Table 2).

Size of synaptic junctions on dendritic spines and shafts

We also determined whether the postsynaptic element where the synapses were established (dendritic spines or shafts) was associated with differences in the size of PSDs. Unambiguous identification of spines required the dendritic spine to be visually traced to the parent dendrite within the 3D stack of serial sections. Similarly, dendritic shafts needed to be followed inside the stack until they could be clearly identified. For this analysis, we studied 6000 synapses whose postsynaptic targets were successfully identified. We found that the mean SAS area of synapses located on dendritic shafts ($88795.98 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 2210.16$) was larger than the mean SAS area of those located on necks ($57879.38 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 3998.65$) and spine heads ($65164.05 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 797.26$) (MW tests, $p < 0.001$). This difference could be due to the fact that SS, which are larger than AS, were predominantly located on dendritic shafts (in this sample, 73.39% of SS were located on shafts, while only 14.61% of AS were located on shafts). To rule out this possibility, we analyzed AS and SS independently. We found that the mean

2013, Knott et al 2008, Merchan-Perez et al 2009, Morgan & Lichtman 2013, Smith 2007). For example, using focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB/SEM), large numbers of synaptic junctions can be three-dimensionally segmented from serial sections (Morales et al 2011). Simple measurements of these segmentations of synaptic junctions, such as the Feret's diameter (the diameter of the smallest sphere circumscribing the three-dimensional object) can be obtained (Anton-Sanchez et al 2014, Merchan-Perez et al 2014). The main advantage of Feret's diameter is its simplicity, although it provides no information about shape, since clearly two objects with the same Feret's diameter may have very different shapes. Therefore, we developed a more accurate method to estimate the size and shape of synapses that involves extracting the synaptic apposition surface (SAS) from synaptic junctions segmented in three dimensions (Morales et al 2013). Since the AZ and the PSD are located face to face, their surface areas are very similar (Schikorski & Stevens 1997, Schikorski & Stevens 1999) and can be represented by a single surface, the SAS, representing the surface of apposition between the AZ and the PSD. The surface area of the SAS may thus be related to relevant synaptic features such as the probability of release or the number of postsynaptic receptors, as mentioned above. In addition to quantitative information about the size of the synaptic junction, the SAS provides qualitative visual information about its shape, such as curvature, perimeter tortuosity or the presence of perforations.

In this work, we have studied the size and shape of AS and SS on spines and dendritic shafts in the neuropil of all cortical layers of the somatosensory cortex, to determine if there are differences between cortical layers and between different types of synapses. We used a large, quantitative database of synaptic junction that were fully segmented in 3D ($n = 6891$) from Wistar rats at postnatal day 14. We extracted and measured the SAS of these synapses using the method developed by Morales et al (2013). This experimental animal—at this age—was selected since we intended to integrate these data with other anatomical, molecular, and physiological data that have already been collected from the same cortical region of the postnatal day 14 Wistar rat. The final goal was to obtain accurate quantitative data that help to create a detailed, biologically accurate model of circuitry for all layers in the primary somatosensory cortex, within the framework of the Blue Brain Project (Markram et al 2015).

Materials and methods

Animals and Tissue Preparation

Three male Wistar rats sacrificed on postnatal day 14 were used for this study. Animals were administered a lethal intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg) and were intracardially perfused with 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). The brain was then extracted from the skull and processed for electron microscopy according to a previously described protocol (Merchan-Perez et al., 2009). Briefly, the brains were extracted from the skull and post-fixed at 4°C overnight in the same solution. Vibratome sections were obtained (150 μ m thick). Sections containing the primary somatosensory cortex (hindlimb representation) were selected with the help

of an atlas (Paxinos & Watson 2007). The sections were then osmicated for 1 h at room temperature in PB with 1% OsO₄, 7% glucose and 0.02 M CaCl₂. After washing in PB, the sections were stained *en bloc* for 30 min with 1% uranyl acetate in 50% ethanol at 37°C, and were then flat-embedded in Araldite. These tissue samples have been used previously to describe the proportions and densities of AS and SS synapses on spines and dendritic shafts across all cortical layers, as well as the occurrence of single or multiple synapses on the same spine (Santuy et al 2017).

All animals were handled in accordance with the guidelines for animal research set out in the European Community Directive 2010/63/EU, and all procedures were approved by the local ethics committee of the Spanish National Research Council (CSIC).

Three-Dimensional Electron Microscopy

Three-dimensional brain tissue samples of the somatosensory cortex (hindlimb representation) were obtained using combined focused ion beam milling and scanning electron microscopy (FIB/SEM). We used a Crossbeam® Neon40 EsB electron microscope with a field emission SEM column and a Gallium FIB (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany). To select the exact location to be imaged and to identify the cortical layers, we obtained semithin sections (2 μ m thick) from the block surface and stained them with toluidine blue. These sections were then photographed with a light microscope. The last of these light microscope images (corresponding to the section immediately adjacent to the block face) was then collated with SEM photographs of the block face. A gallium ion beam was used to mill the sample, removing thin layers of material on a nanometer scale. After removing each slice (20 nm thick), the milling process was paused, and the freshly exposed surface was imaged with a 1.8-kV acceleration potential using an in-column energy selective backscattered electron detector. The milling and imaging processes were sequentially repeated in a fully automated way, and long series of images were acquired, thus obtaining a stack of images that represented a 3-dimensional sample of the tissue (Merchan-Perez et al 2009). Twenty-nine different stacks of images of the neuropil in the six layers of the somatosensory cortex were obtained (three samples from layer I, four from layer II, ten from layer III, five from layer IV, three from layer V and four from layer VI). All these stacks were used previously for the study of the density and three-dimensional distribution of synapses (Anton-Sanchez et al 2014, Merchan-Perez et al 2014), as well as for the quantitative estimation of the subcellular location of synapses on spines and dendritic shafts (Santuy et al 2017). This study was performed in the neuropil, so we used stacks of images that did not contain cell somata or blood vessels. Image resolution in the xy plane ranged from 3.7 to 4.5 nm/pixel. Resolution in the z axis (section thickness) was 20 nm. With these resolution parameters, we obtained images of 2048 x 1536 pixels, so the field of view was 7.56 x 5.68 μ m at 3.7 nm/pixel. Noise reduction was performed by line averaging, and the acquisition time per image was approximately four minutes. Although the resolution of FIB/SEM images can be increased, we chose these parameters as a compromise solution to obtain a large enough field of view where synaptic junctions

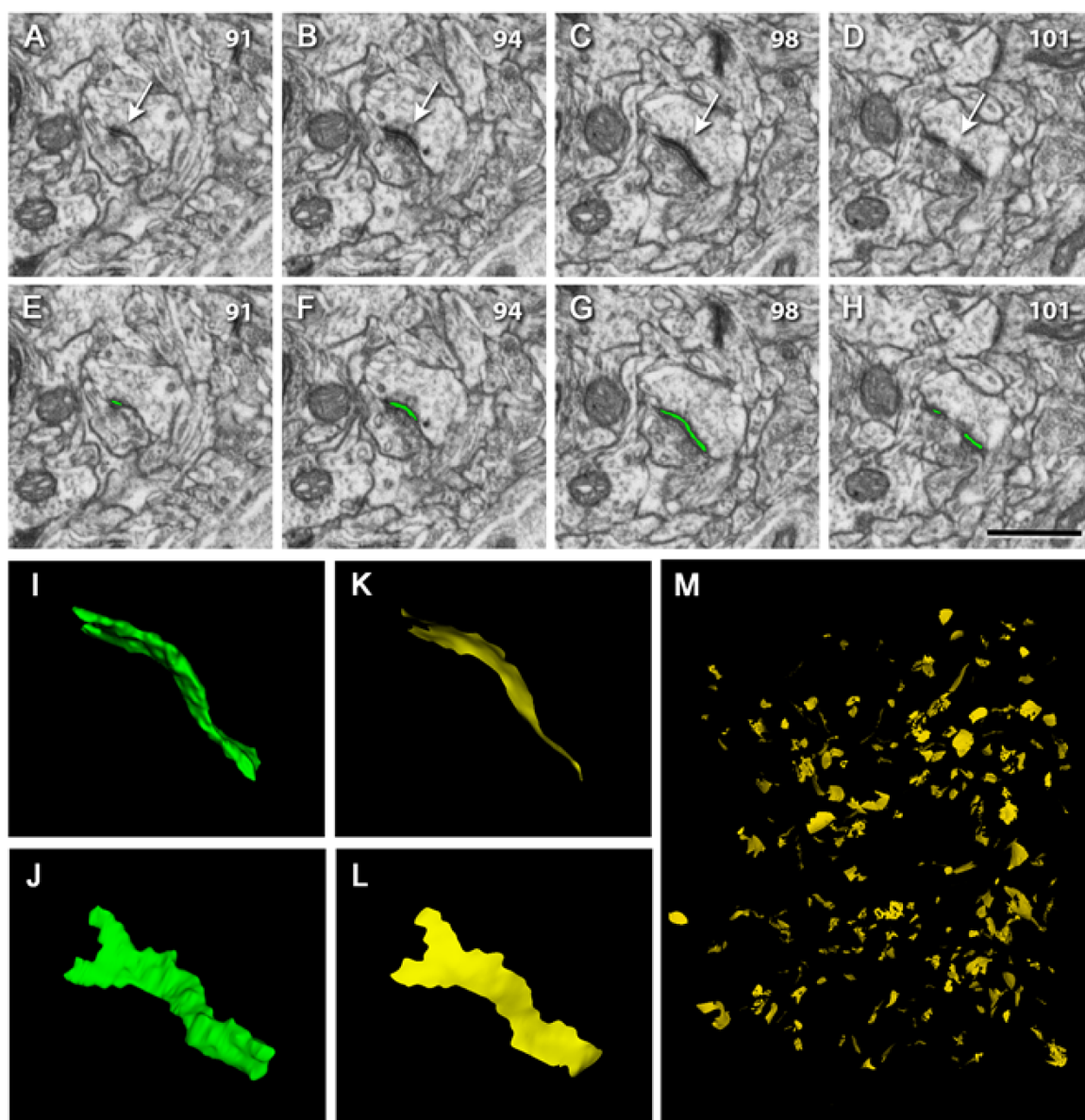
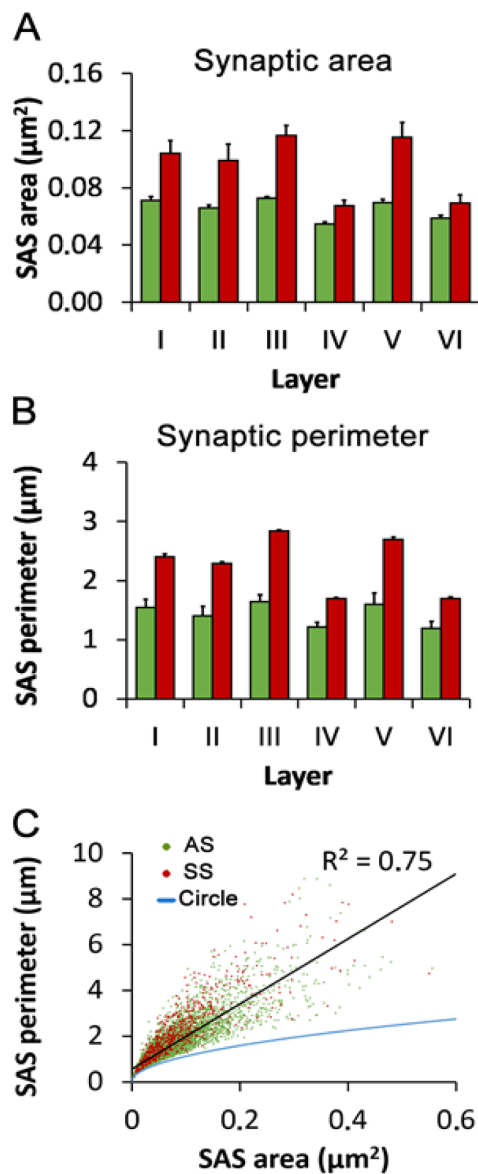


Figure 1. Identification, segmentation and extraction of the synaptic apposition surface (SAS) of a synaptic junction from serial images obtained with combined Focused Ion Beam milling and Scanning Electron Microscopy (FIB/SEM). (A-D) Sections 91, 94, 98 and 101 from a stack of serial sections obtained with FIB/SEM from the rat somatosensory cortex. Identification of an asymmetric synapse whose prominent postsynaptic density is clearly visible (arrow). Note that the identification was not based on single images but on the examination of the full sequence of images where the synapse was visible (numbers in the top-right corner of each frame correspond to section number; each individual section was 20 nm thick). (E-H) Segmentation of the synaptic junction (green) with Espina software. (I, J) The resulting 3D object representing the synaptic junction (green) visualized from two different angles. (K, L) The SAS (yellow) that has been extracted from the 3D synaptic junction shown in (I) and (J). (M) Panoramic view of all the SAS extracted from a whole stack of images. Scale bar in (H): 1 μ m for (A-H).



SAS area of AS located on shafts ($78255.07 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 2413.73$) was larger than those located on dendritic spine heads ($65196.81 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 811.93$) (MW test, $p < 0.001$) and the ones on spine heads were larger than those on necks ($52326.09 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 4394.36$) (MW test, $p = 0.04$). Similarly, the mean SAS areas of SS were larger on shafts ($109798.76 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 4358.62$) compared to dendritic spine heads ($63808.43 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 3592.90$) and necks ($74697.93 \text{ nm}^2 \pm \text{sem} = 8576.53$) (MW tests, $p < 0.001$), although the difference between SS on spine heads and necks was not statistically significant (MW tests, $p = 0.33$). Therefore, synapses located on dendritic shafts were larger than those located on dendritic spines, both for AS and SS. When single cortical layers were analyzed, we also found that the mean SAS area of synapses established on dendritic shafts was always larger than SAS areas of synapses on dendritic spines (Supplementary Table 5). In spite of the differences in the mean SAS areas mentioned above, the frequency histograms of SAS areas of AS and SS on dendritic shafts and spines greatly overlapped, as shown in Figure 4.

The shape of synaptic junctions

The shape of synaptic junctions was very variable (Figure 5) but can be categorized into three main types. Most cortical synapses had disc-shaped, macular PSDs (93%). A small percentage had perforations, with one or more holes in the PSD (4.5%), while an even smaller proportion (2.5%) had a tortuous horseshoe-shaped perimeter with an indentation. Macular and perforated synapses followed the previously described 9:1 proportion between AS and SS, but in the case of horseshoe-shaped PSDs, this proportion was 8:2, indicating that horseshoe-shaped synaptic junctions were relatively more frequent among SS than among AS (Chi squared, $p < 0.001$).

The mean SAS area of macular synapses was smaller (mean $\pm \text{sem} = 61737.72 \text{ nm}^2 \pm 606.10$) than horseshoe-shaped synapses ($148469.66 \text{ nm}^2 \pm 6321.63$) (MW test, $p < 0.001$) and the mean SAS area of horseshoe-shaped synaptic junctions was smaller than that of perforated synapses ($176710.07 \text{ nm}^2 \pm 5875.00$) (MW test, $p = 0.005$) (Table 3). Despite the differences in the mean SAS areas, perforated and horseshoe-shaped synaptic junctions were intermingled with the predominant macular synaptic junctions (Figures 5 and 6 and Supplementary Table 6). The perimeter of macular synapses was shorter ($1423.96 \text{ nm} \pm 10.22$) than horseshoe-shaped

Figure 2. Size and perimeter of synaptic junctions (mean \pm sem). (A) Surface area of synaptic apposition surfaces (SAS) of asymmetric synapses (AS, green bars) and symmetric synapses (SS, red bars) in the six cortical layers. AS were smaller than SS in all layers (MW tests, $p < 0.001$ in layers I to V; $p = 0.026$ in layer VI). For both AS and SS, the largest SAS were found in layer III and the smallest were found in layer IV. Detailed pair-wise statistical comparisons between synaptic types and layers can be found in Supplementary Tables 1 and 2. (B) Perimeters of SAS of AS (green bars) and SS (red bars) in the six cortical layers. Perimeters of SAS showed similar differences to SAS areas. Detailed pair-wise statistical comparisons between synaptic types and layers can be found in Supplementary tables 3 and 4. (C) Scatter plot showing the relationship between SAS areas and perimeters. AS are represented as green dots and SS as red dots. The blue trace indicates the perimeter/area relation of a circle, as a reference. There is a strong correlation between SAS area and perimeter ($R^2 = 0.75$ for AS and SS pooled together, black trace). If we compare the perimeter/area relation of a circle (blue trace) with the SAS perimeter/area plot of SAS, it is clear that SAS perimeters grow faster than the perimeter of a circle, indicating that SAS perimeters tend to be more tortuous as SAS area increases.

	AS				SS			
	Mean SAS area ± sem (nm ²)	n	μ	σ	Mean SAS area ± sem (nm ²)	n	μ	σ
Layer I	70834.87 ± 2649.41	594	10.81	0.88	104309.94 ± 8741.68	77	11.29	0.78
Layer II	58987.37 ± 1788.36	992	10.72	0.83	87757.53 ± 8875.47	64	11.14	0.72
Layer III	72729.58 ± 1209.78	2212	10.93	0.74	116703.42 ± 6735.43	185	11.42	0.72
Layer IV	54770.81 ± 1245.29	1200	10.65	0.73	68355.35 ± 3896.95	172	10.88	0.73
Layer V	69682.16 ± 2210.41	684	10.85	0.81	113353.40± 10086.08	62	11.41	0.69
Layer VI	58668.28 ± 2050.82	577	10.73	0.70	69382.12 ± 5695.64	72	10.90	0.76
Layers I-VI	65299.31± 697.16	6259	10.84	0.79	93384.53 ± 3001.23	632	11.17	0.78

Table 1. Mean synaptic apposition surface (SAS) area (nm² ± sem), number of synaptic SAS analyzed (n), and the location (μ) and scale (σ) of the best-fit log-normal distributions in the six cortical layers. Unweighted means for layers I to VI are also given. AS: asymmetric synapses; SS: symmetric synapses.

	AS				SS			
	Mean SAS perimeter ± sem (nm)	n	μ	σ	Mean SAS perimeter ± sem (nm)	n	μ	σ
Layer I	1538.03 ± 42.13	594	7.16	0.60	2405.01 ± 142.87	77	7.65	0.55
Layer II	1365.80 ± 29.46	992	7.06	0.55	2141.62 ± 130.11	64	7.55	0.52
Layer III	1638.51 ± 19.64	2212	7.27	0.59	2838.22 ± 118.19	185	7.81	0.54
Layer IV	1221.79 ± 18.70	1200	6.99	0.47	1704.83 ± 77.28	172	7.29	0.54
Layer V	1602.44 ± 38.50	684	7.22	0.56	2736.41 ± 186.46	62	7.77	0.50
Layer VI	1191.59 ± 25.83	577	6.97	0.45	1697.00 ± 112.65	72	7.29	0.55
Layers I-VI	1460.71 ± 11.29	6259	7.14	0.54	2266.44 ± 54.61	632	7.56	0.59

Table 2. Mean SAS perimeter (nm ± sem), number of synapses analyzed (n), and the location (μ) and scale (σ) of the log-normal distributions of SAS perimeters in the six cortical layers. Unweighted means for layers I to VI are also shown. AS: asymmetric synapses; SS: symmetric synapses.

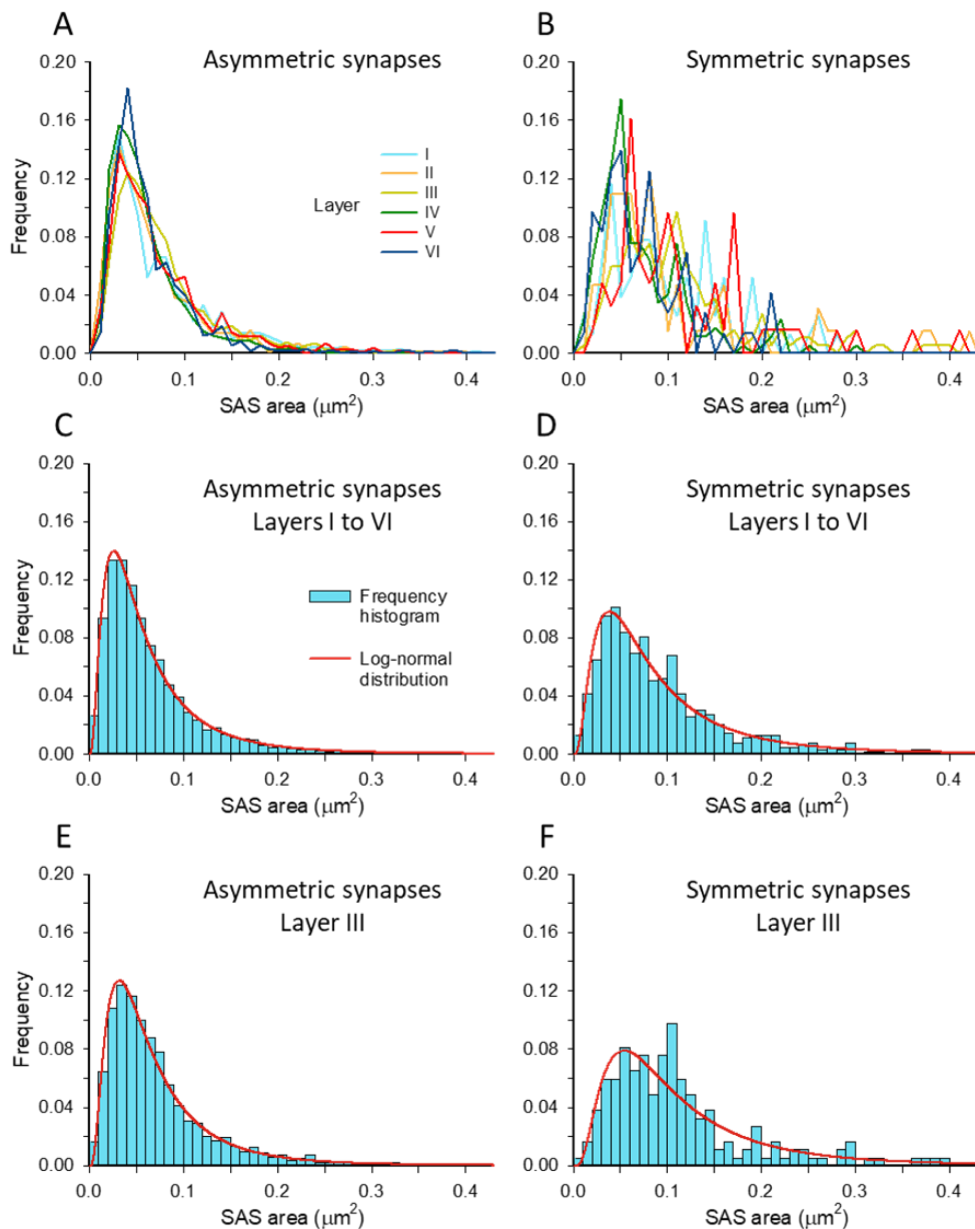


Figure 3. Frequency histograms of SAS areas and their corresponding best-fit probability density functions. Frequency histograms of SAS areas in the six cortical layers are represented for AS and SS in (A) and (B), respectively. Histograms for AS from different layers had similar shapes and overlapped greatly, while histograms for SS were more irregular. AS and SS from all layers have been pooled together to build the frequency histograms (blue bars) represented in (C) and (D). The best-fit distributions representing the theoretical probability density functions (red traces) have been represented with their corresponding frequency histograms. As an example for an individual layer, histograms and best-fit distributions for AS and SS from layer III have been represented in (E) and (F). The best-fit probability function was a log normal distribution in all cases. Curve fitting was always better for AS (C and E) than for SS (D and F), probably because of the smaller sample size of SS (see Table 1). The parameters μ and σ of the log-normal curves are shown in Table 1. Frequency histograms and best-fit log-normal distributions for layers not shown here have been included in Supplementary Figures 1 and 2.

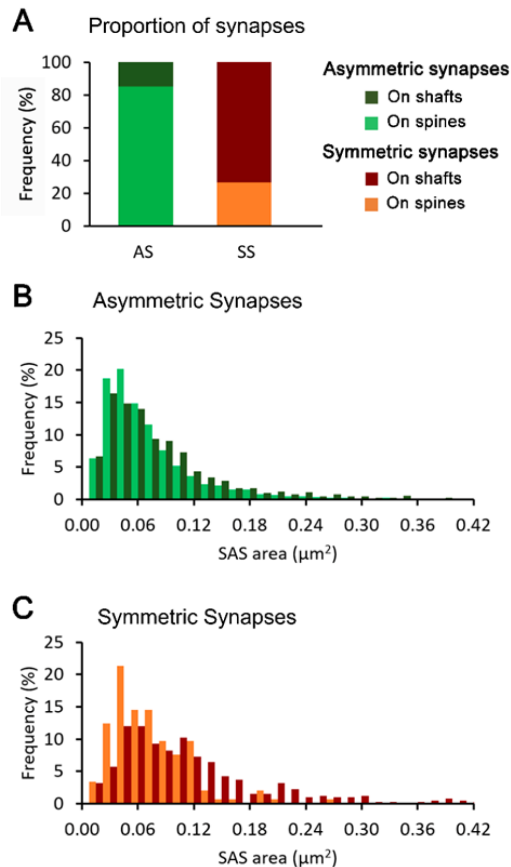


Figure 4. SAS areas of synapses on dendritic spines and shafts. (A) Proportions of asymmetric and symmetric synapses on dendritic spines and shafts. **(B)** Frequency histograms of SAS areas of asymmetric synapses on dendritic spines (light green) and on dendritic shafts (dark green). **(C)** Frequency histograms of SAS areas of symmetric synapses on dendritic spines (orange) and on dendritic shafts (dark orange). Frequencies in (B) and (C) have been normalized for each individual category.

synapses ($3124.70 \text{ nm} \pm 107.62$) (MW test, $p < 0.001$) and perforated synapses ($3106.10 \text{ nm} \pm 87.94$) (MW test, $p < 0.001$), while horseshoe-shaped and perforated synapses had similar perimeters (MW test, $p = 0.59$) (Table 3).

For all three categories (macular, perforated and horseshoe-shaped), SS had a larger area and perimeter than AS (Table 3), although these differences were only statistically significant for macular synapses (MW test; $p < 0.001$).

The proportions of macular, horseshoe and perforated synaptic junctions were similar in layers II to VI. However, we found that horseshoe-shaped and perforated synapses were more common in layer I (Chi squared, $p < 0.001$) (Figure

6A). No preference was found in the location of macular, perforated or horseshoe-shaped synapses on spines or dendritic shafts — and this was the case for both AS (Chi squared, $p = 0.22$) and SS (Chi squared, $p = 0.66$).

We also measured SAS curvature by calculating one minus the ratio between the projected area of the SAS and the area of the SAS. This value would equal 0 for a totally flat SAS and it would increase as the SAS becomes more curved or wrinkled (see Methods). Our results indicate that SAS curvature was higher for SS than for AS in all layers (MW tests, $p \leq 0.028$) (Figure 7A). We made pair comparisons of AS curvature between each cortical layer and all the others and we found statistically significant differences between all layers (MW tests, $p < 0.05$) except between layers I and II (MW test, $p = 0.325$), and layers III and V (MW test, $p = 0.14$). For SS, statistically significant differences were found between layers IV and VI (the ones with flattest synapses) and all the other layers (MW tests, $p < 0.001$). Macular synapses were flatter (mean \pm sem, 0.07 ± 0.001) than horseshoe-shaped (0.11 ± 0.005) (MW test, $p < 0.001$) and perforated synapses (0.10 ± 0.003) (MW test $p < 0.001$). Horseshoe-shaped and perforated synapses had similar curvature (MW test, $p = 0.58$) (Table 3). We found no correlation between SAS area and curvature ($R^2 = 0.08$ for AS; $R^2 = 0.03$ for SS) (Figure 7B).

Discussion

In the present study, we used a new method to estimate the size and shape of synapses that involved extracting the SAS from synaptic junctions segmented in three dimensions, using combined focused ion beam milling and scanning electron microscopy. This study provided three main findings. Firstly, the mean SAS areas were smaller for AS than for SS in all cortical layers and these differences were statistically significant in all cases. For both AS and SS, the largest mean SAS areas were found in layer III and the smallest mean SAS areas were found in layer IV. In all cases (AS and SS, in all layers), the distributions of synaptic junction size followed a skewed curve with a long tail to the right, corresponding to a log-normal distribution. Secondly, most cortical synapses had disc-shaped, macular PSDs (93%). A few were perforated, with one or more holes in the PSD (4.5%), while an even smaller proportion (2.5%) showed a tortuous horseshoe-shaped perimeter with a deep indentation. Thirdly, the SAS curvature was larger for SS than for AS in all layers. However, there was no correlation between SAS area and curvature for AS or SS.

Methods to estimate the size of synaptic junctions

Several methods have traditionally been used to estimate the size of synaptic junctions. The simplest of these methods is to measure the cross-sectional length of synaptic junctions in TEM micrographs. This method has obvious limitations since it is based on individual 2D images where a portion of synapses cannot be fully characterized (for example, see DeFelipe et al (1999)), and it also reduces size estimation to a one-dimensional measurement that is not equivalent to any easily interpretable geometrical measure such as the mean diameter, for example. Methods that use serial sections can yield more reliable measurements, even if only simple measurements such as the maximum width of the PSD are used (Tarusawa et al 2009). The cross-sectional length of the

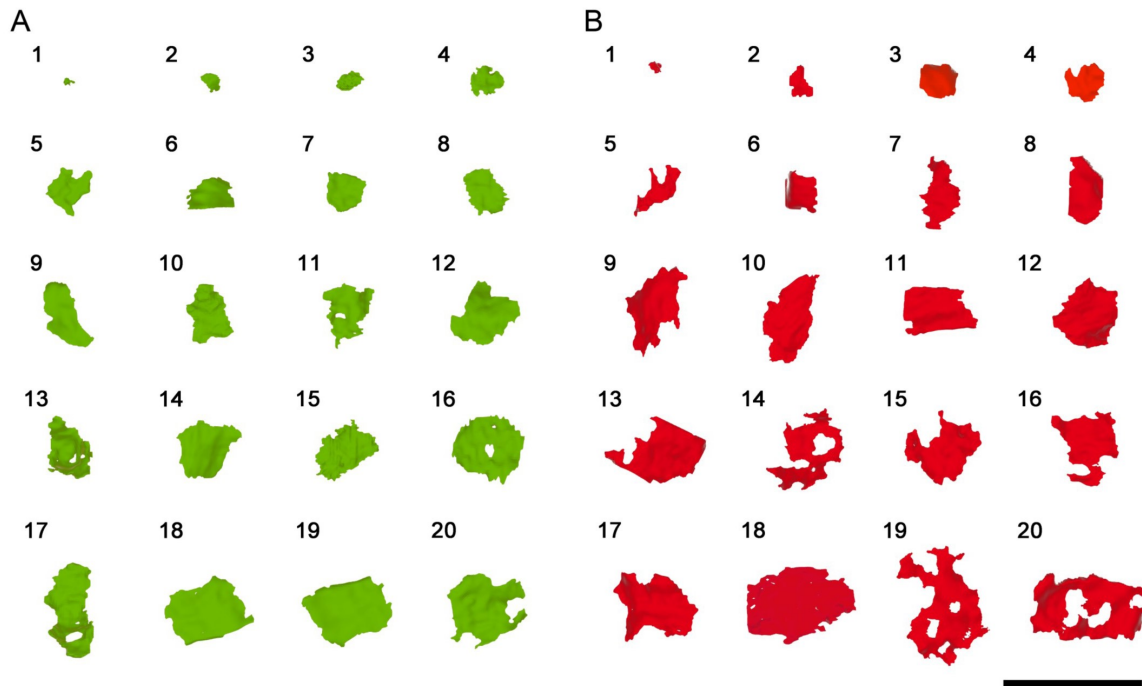


Figure 5. Representative sample of synaptic apposition surfaces of asymmetric and symmetric synapses. (A) Synaptic apposition surfaces of asymmetric synapses (green) were distributed into 20 bins of equal size. An example within each bin has been represented here. **(B)** Synaptic apposition surfaces of symmetric synapses (red) that were distributed and selected as in (A). Calibration bar = 1 μ m.

PSD can also be measured in each section of the series and multiplied by section thickness and by number of sections (Arellano et al 2007, Bopp et al 2017, Hsu et al 2017). Alternatively, the PSD can be reconstructed from the series of sections and its contour can be measured in 3D (Bosch et al 2015, Bosch et al 2016, Dufour et al 2015, Rodríguez-Moreno et al 2017, Rollenhagen et al 2015). Another measurement that has been used to estimate the size of synaptic junctions in 3D is the diameter of Feret, which is equivalent to the diameter of the smallest sphere circumscribing the reconstructed object (Merchan-Perez et al 2014). The Feret's diameter is a simple and reliable measurement that can be automatically obtained at a low computational cost, and it has been shown to be useful to build models that reproduce the distribution of synapses in three-dimensional space (Anton-Sanchez et al 2014). However, it does not accurately describe the morphology of synapses, since it obviously oversimplifies the geometric characteristics of the measured object, and it is clear that objects with very different morphologies can have similar Feret's diameters. Another indirect measurement of the size of the synaptic junction is the axon-spine interface, which represents the surface of contact between the axonal bouton and the dendritic spine (de Vivo et al 2017). Accuracy is again an issue here since, although the area of the axon-spine interface and the PSD are correlated (Cheetham et al 2014), the axon-spine interface provides no information on the *shape* of the PSD.

Synaptic apposition surface

In the present study, we used the synaptic apposition surface (SAS) because it has three main advantages over the methods outlined above. First, it is extracted automatically from the previously segmented synaptic junction with no user intervention, thus avoiding any manual tracing of contours and possible associated user bias (Alonso-Nanclares et al 2013, Morales et al 2013). Second, despite being a surface, the SAS is also a 3D object that adapts to, and reproduces the shape and curvature of the PSD. Therefore, the SAS can be visualized in 3D to obtain qualitative information such as the presence of perforations or indentations (see Figure 5). Third, quantitative information on the surface area, perimeter and curvature can also be extracted from the SAS, so size and shape can easily be correlated. Given that the initial segmentation of synaptic junctions has been performed within 3D tissue samples using a semi-automatic method (Morales et al 2011), and the SAS have been extracted in a fully automated way, we have been able to obtain 6,891 synaptic junctions whose shape and size have been analyzed in the six cortical layers. Additionally, we have been able to unambiguously identify the postsynaptic target (dendritic spines or shafts) in 6,000 of these synaptic junctions.

Size of synaptic junctions

The size of both types of synaptic junctions (asymmetric and symmetric) follows log-normal distributions. Despite the fact

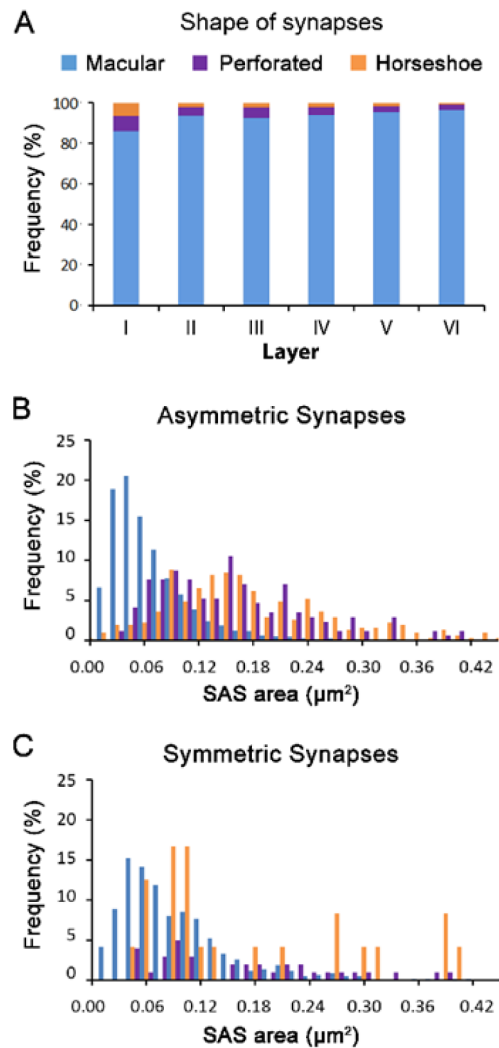


Figure 6. Distribution of synapses of different shapes. (A) Proportion of macular (blue), perforated (purple) and horseshoe-shaped (orange) synapses in the six layers of the cortex. Layer I shows a higher proportion of perforated and horseshoe synapses when compared to layers II–VI (Chi squared, $p < 0.001$). **(B)** Frequency histograms of the SAS area of macular, perforated and horseshoe-shaped asymmetric synapses. **(C)** Frequency histograms of the SAS area of macular, perforated and horseshoe-shaped symmetric synapses. Frequencies in (B) and (C) have been normalized for each individual category. (See also Supplementary table 6).

that the mean SAS area is larger for SS than for AS, their respective distributions greatly overlap (Figure 3), so it would be impossible to distinguish AS from SS on the basis of synaptic junction size alone. It is tempting to correlate the log-normal distribution of synaptic sizes with other parameters such as synaptic strength and spike transmission probability, which also follow log-normal distributions (reviewed by Buzsaki and Mizuseki (2014)). For example, the distribution of the size of unitary excitatory postsynaptic potentials (EPSP) is very similar to the distribution of the size of SAS reported here, with a skewed envelope and a long tail to the right (Lefort et al 2009, Song et al 2005). Moreover, the EPSP amplitude strongly correlates with the number of postsynaptic AMPA receptors and with spine head volume (Araya 2014, Kasai et al 2003, Matsuzaki et al 2001), which in turn strongly correlates with PSD size (Arellano et al 2007). Model experiments also suggest that PSD size has a strong influence on the activation of postsynaptic receptors (Montes et al 2015). It is also interesting to note that the event-to-event variability of synaptic strength for individual synapses is largest for weaker synapses and decreases for stronger synapses (Ikegaya et al 2013, Lefort et al 2009). This may also be related to synaptic junction size, since the same phenomenon—a decrease in variability as synaptic size increases—has been described in model experiments (Franks et al 2002, Montes et al 2015). This suggests that large synapses have a higher number of receptors and are not only stronger, but also have a more homogeneous and reliable response. However, it is important to note that the amplitude of the EPSP also depends on the geometry of postsynaptic dendrites (Eyal et al 2014, Major et al 2013), as well as on the morphology of dendritic spines (Araya 2014, Gullledge et al 2012). Another important source of variability is the number of postsynaptic receptor molecules in individual synapses. For example, it has been shown in the hippocampus that the number of AMPA receptors as a function of synaptic size has different slopes in the synapses established between Shaffer collaterals and CA1 dendritic spines and in the synapses between mossy fibers and CA3 spines (Nusser et al 1998). In the somatosensory cortex of the rat, AMPA receptor concentration is similar in synapses of different sizes; thus, the larger the synapse the higher the actual number of AMPA receptors (Kharazia & Weinberg 1999), while NMDA receptors are found at a higher concentration in smaller synapses. In any case, it is obvious that the distribution of different types of receptors among different types of synapses is a complex issue (Hadzic et al 2017), so the relationship between synaptic size and receptor number is not simple and requires further research.

Different synaptic sizes have been associated with different functions. For example, it has been proposed that small dendritic spines are preferential sites for long-term potentiation induction, whereas large spines might represent physical traces of long-term memory (Kasai et al 2010, Matsuzaki et al 2004). Our data show that synaptic size follows a log-normal distribution, which is unimodal and continuous, so neither AS nor SS can be divided into two groups on the basis of synaptic junction size. Therefore, if the function of “learning or memory” synapse depends on

Shape of synaptic junction	Type of synapse	Area of SAS (nm ²) mean ± sem	Perimeter (nm) mean ± sem	Curvature mean ± sem
Macular	AS	59271.15 ± 595.95	1353.95 ± 9.55	0.07 ± 0.001
	SS	86903.65 ± 2816.34	2138.30 ± 51.47	0.09 ± 0.003
	AS+SS	61737.72 ± 606.10	1423.96 ± 10.22	0.07 ± 0.001
Perforated	AS	175955.57 ± 5842.02	3056.56 ± 85.68	0.10 ± 0.004
	SS	185606.8 ± 30594.69	3690.38 ± 488.31	0.08 ± 0.010
	AS+SS	176710.07 ± 5875.00	3106.10 ± 87.94	0.10 ± 0.003
Horseshoe-shaped	AS	146689.44 ± 6756.57	3015.70 ± 109.07	0.11 ± 0.006
	SS	155387.11 ± 16435.88	3548.22 ± 304.55	0.08 ± 0.009
	AS+SS	148469.66 ± 6321.63	3124.70 ± 107.62	0.11 ± 0.005

Table 3. Area (nm²), perimeter (nm) and curvature (mean ± sem) of the SAS of macular, perforated and horseshoe-shaped synaptic junctions. AS: asymmetrical synapses; SS: symmetrical synapses. All data are given as mean ± sem.

synaptic size, there would not be a clear-cut transition between the two types of synapse. Additionally, It has been proposed that the functional role of synapses may also depend on the sharp decrease of event-to-event variability as synaptic size grows, so the functional transition between “learning and memory” synapses would be faster than if it depended on synaptic size alone (Montes et al 2015). In any case, if synapses of different sizes serve different functions, synapses on dendritic shafts must also be taken into account. Although such synapses are not the predominant type (about 15% of AS and 73% of SS; see also (Santuy et al 2017), their mean sizes are larger than axospinous synapses, both for AS and SS.

Horseshoe-shaped and perforated synapses

Synaptic junctions with deep indentations (horseshoe synapses) and perforated synapses were scarce in our sample; even if we pool together horseshoe-shaped and perforated synapses, they only accounted for about 7% of the whole population. The question arises about whether they are a separate population of synapses, with different morpho-functional features from the predominant macular synapses. These types of synapses are mainly located in the right tail of the synaptic size distributions, so their mean area is larger than the mean area of macular synapses, in line with numerous studies (Calverley & Jones 1987, Geinisman et al 1987, Harris et al 1992, Jones & Calverley 1991). Nevertheless, their sizes also greatly overlap with macular synapses, so there is not a boundary separating them from macular synapses (Fig. 6). Regarding the shape of horseshoe and perforated synapses, again we did not find any boundary, since the perimeter tends to be more complex as the PSD gets larger, regardless of the presence of perforations.

If we interpret perforations and deep indentations as dynamic, non-permanent, features that may only depend on the molecular turnover of the constituents of the PSD, then perforated and horseshoe PSDs would belong to the same

pathway as macular PSDs. The smallest synapses would have a macular shape whose perimeter would get progressively more tortuous as they grow. Deep indentations and perforations would appear (and eventually disappear) as the PSD becomes larger. The incorporation of receptors into the PSD depends on lateral diffusion from the surrounding plasma membrane (Choquet & Triller 2013, Li & Blanpied 2016) and on processes of endocytosis and exocytosis from the endosomal compartment (Choquet & Triller 2013, Kneussel & Hausrat 2016). In this scenario, we can hypothesize that indentations and perforations could be the morphological correlate of a more active —or just more apparent— turnover of receptors in larger PSDs. In fact, it has been shown in the hippocampus that the relative proportions of horseshoe, perforated and fragmented or partitioned synapses (synapses that have several irregular small disc-shaped PSDs, with no connection between them) do change after the induction of long-term potentiation (Geinisman et al 1993, Toni et al 2001). This phenomenon may or may not take place in the neocortex, where we have found horseshoe and perforated PSDs but not partitioned synapses. The fact that very different types of synapses such as AS and SS have perforations also suggests that these perforations are the result of a general, non-specific mechanism, related to synaptic growth and remodeling.

Alternatively, perforated and probably also horseshoe-shaped synaptic junctions may belong to different populations of synapses. The main argument favoring this hypothesis is that in certain terminals, specifically in thalamocortical boutons in layer IV, perforated synapses are frequent (Bopp et al 2017, Rodríguez-Moreno et al 2017), while they are scarce if we consider the whole synaptic population. Our data seems to contradict this hypothesis mainly because the proportion of perforated synapses is very similar in layers II to VI. However, thalamocortical synapses represent only a minor proportion of layer IV synapses (less than 10%; e.g., see da Costa and Martin (2009)) and, therefore, their number may not be high enough to

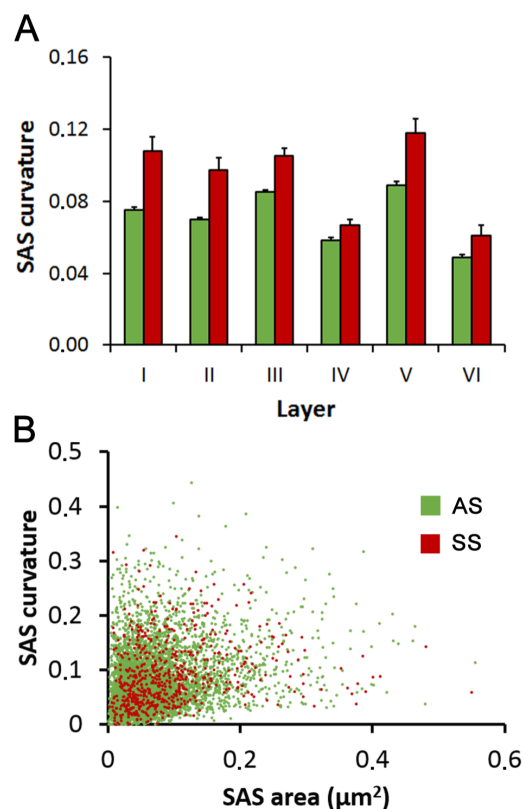


Figure 7. Curvature of the synaptic apposition surfaces (SAS). (A) SAS curvature of AS and SS in the six cortical layers (mean \pm sem). SAS curvature was larger for SS (red bars) than for AS (green bars) in all layers. For AS, statistically significant differences were found between all layers (MW tests <0.05) except between layers I and II (MW test, $p=0.325$) and layers III and V (MW test, $p=0.14$). Curvature differences between SS were found between layers IV and VI and all the other layers (MW tests, $p<0.001$). (B) Scatter plot representing the relationship between SAS curvature and area of AS (green dots) and SS (red dots). There was no correlation between SAS area and curvature for AS or SS ($R^2 = 0.08$ for AS; $R^2 = 0.03$ for SS).

contribute to a significant difference with other layers. Species and age differences must also be taken into consideration, since the proportion of perforated synapses in layer II/III of the visual and frontal cortices of the adult mouse seem to be larger than those reported here (Hsu et al 2017).

Curvature of the synaptic apposition surfaces.

The relevance of the curvature of the synapse has been discussed since the seventies when Jones and Devon (1978) described changes in the curvature when administering anesthetics. Diverse studies led to the conclusion that positively curved synapses represented functional synapses, while negatively curved synapses were non-functional. Later studies revoked this view, as they showed that many other

factors could influence the curvature of synapses (for example, the region studied; positively curved synapses predominated in the cortex while negatively curved synapses predominated in the hippocampus) (Calverley & Jones 1990). Nevertheless, more recent studies suggest that changes in the synaptic curvature may influence synaptic efficacy (Medvedev et al 2010). In the present study, we found that SAS curvature was larger for SS than for AS in all layers. Furthermore, for AS, statistically significant differences were found between all layers except between layers III and V. Curvature differences between SS were found between layer IV and all the other layers, and this was also the case for layer VI. Therefore, if synaptic curvature has an influence on synaptic efficacy, our results would indicate that this characteristic is layer and synaptic-type dependent. However, there was no correlation between SAS area and curvature for AS or SS. Since the area of the SAS seems to be related to the strength of synapses, the significance of the differences in synaptic curvature found between different layers and types of synapses observed in the present study remains to be determined.

Concluding remarks

Collectively, the results indicate that there are laminar-specific similarities and differences regarding the size and shape of synaptic junctions. The functional implication of these variations is unknown but they may be related to synaptic attributes of particular synaptic circuits which are characteristic of each layer. The data obtained in the present study is based on the analysis of thousands of 3D-segmented synaptic junctions, providing a robust set of morphological data. Since currently-available 3D quantitative data are rather scarce and mainly based on individual cases, the present results in conjunction with other crucial microanatomical data—such as the number and distribution of different types of synapses and the identification of postsynaptic targets in different cortical layers—will help to better understand the structure of microcircuits and to build realistic cortical models.

Acknowledgements

We thank A. I. Garcia for technical assistance. This work was supported by grants from the following entities: the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grants SAF 2015-66603-P and the Cajal Blue Brain Project, Spanish partner of the Blue Brain Project initiative from EPFL); the European Union Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 720270 (Human Brain Project); and Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, CB06/05/0066, Spain).

Authors declare that no financial or non-financial competing interests exist

References

- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, DeFelipe J. 2008a. Gender differences in human cortical synaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14615-19

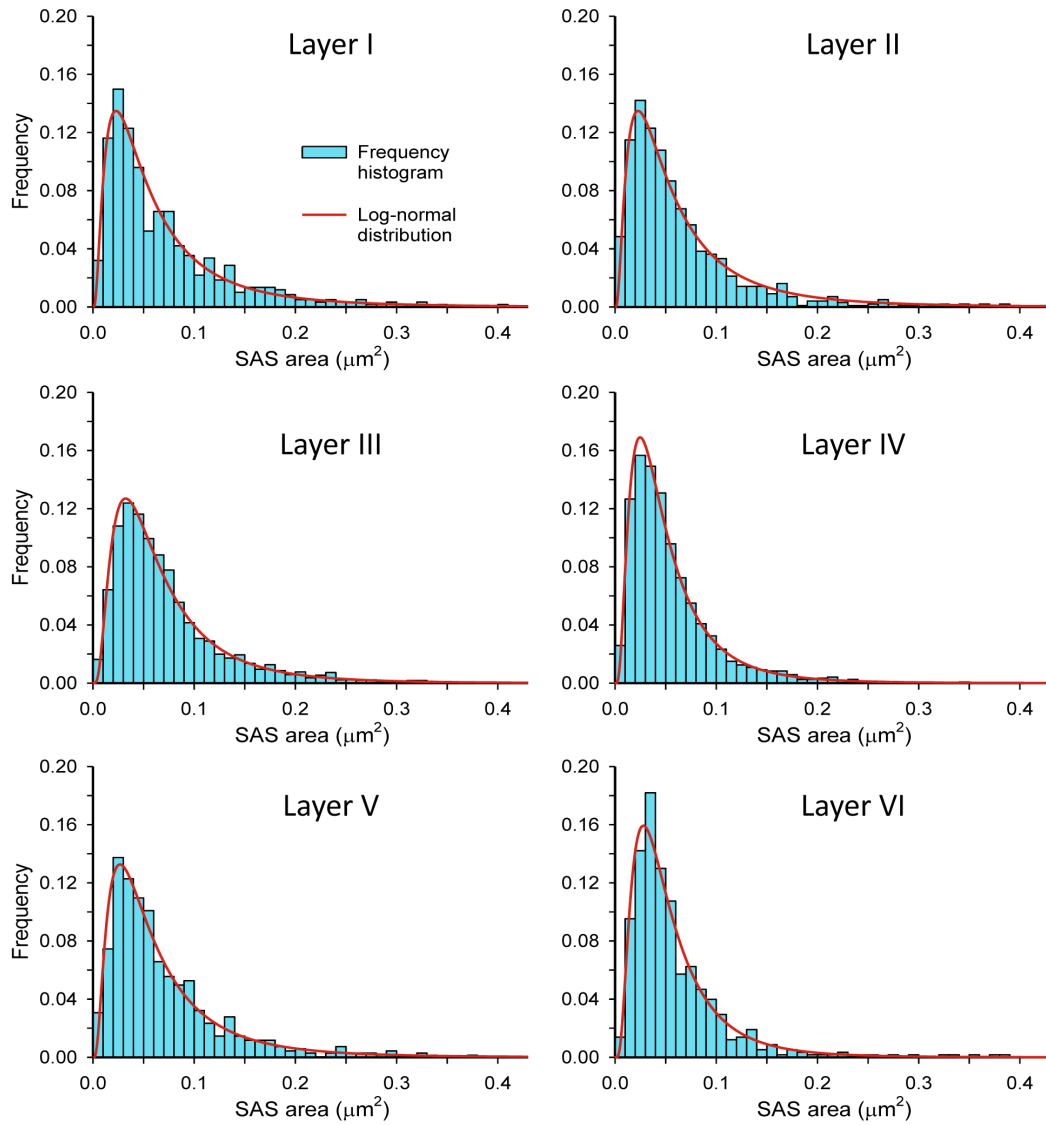
- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, DeFelipe J. 2008b. Gender differences in human cortical synaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 14615-9
- Alonso-Nanclares L, Merino-Serrais P, Gonzalez S, DeFelipe J. 2013. Synaptic changes in the dentate gyrus of APP/PS1 transgenic mice revealed by electron microscopy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72: 386-95
- Anton-Sanchez L, Bielza C, Merchan-Perez A, Rodriguez JR, DeFelipe J, Larranaga P. 2014. Three-dimensional distribution of cortical synapses: a replicated point pattern-based analysis. *Front Neuroanat* 8: 85
- Araya R. 2014. Input transformation by dendritic spines of pyramidal neurons. *Front Neuroanat* 8: 141
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. 2007. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci* 1: 131-43
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, et al. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 9: 557-68
- Beaulieu C, Colonnier M. 1985. A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *The Journal of comparative neurology* 231: 180-9
- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KA, Schuhknecht GF. 2017. An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37: 2435-48
- Bosch C, Martinez A, Masachs N, Teixeira CM, Feraud I, et al. 2015. FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front Neuroanat* 9: 60
- Bosch C, Masachs N, Exposito-Alonso D, Martínez A, Teixeira CM, et al. 2016. Reelin Regulates the Maturation of Dendritic Spines, Synaptogenesis and Glial Ensheathment of Newborn Granule Cells. *Cerebral Cortex* 26: 4282-98
- Branco T, Marra V, Staras K. 2010. Examining size-strength relationships at hippocampal synapses using an ultrastructural measurement of synaptic release probability. *Journal of structural biology* 172: 203-10
- Buzsaki G, Mizuseki K. 2014. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nature reviews. Neuroscience* 15: 264-78
- Calverley RK, Jones DG. 1987. A serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. *Cell and tissue research* 247: 565-72
- Calverley RK, Jones DG. 1990. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain research. Brain research reviews* 15: 215-49
- Cheetham CE, Barnes SJ, Albieri G, Knott GW, Finnerty GT. 2014. Pansynaptic enlargement at adult cortical connections strengthened by experience. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 24: 521-31
- Choquet D, Triller A. 2013. The dynamic synapse. *Neuron* 80: 691-703
- da Costa NM, Martin KA. 2009. The proportion of synapses formed by the axons of the lateral geniculate nucleus in layer 4 of area 17 of the cat. *The Journal of comparative neurology* 516: 264-76
- de Vivo L, Bellesi M, Marshall W, Bushong EA, Ellisman MH, et al. 2017. Ultrastructural evidence for synaptic scaling across the wake/sleep cycle. *Science* 355: 507-10
- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI. 2002. Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of neurocytology* 31: 299-316
- DeFelipe J, Fariñas I. 1992. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology* 39: 563-607
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchán-Pérez A. 1999. Estimation of the Number of Synapses in the Cerebral Cortex: Methodological Considerations. *Cerebral Cortex* 9: 722-32
- Denk W, Horstmann H. 2004. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS biology* 2: e329
- Dufour A, Rollenhagen A, Satzler K, Lubke JH. 2015. Development of Synaptic Boutons in Layer 4 of the Barrel Field of the Rat Somatosensory Cortex: A Quantitative Analysis. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*
- Eyal G, Mansvelder HD, de Kock CP, Segev I. 2014. Dendrites impact the encoding capabilities of the axon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34: 8063-71
- Fauth M, Tetzlaff C. 2016. Opposing Effects of Neuronal Activity on Structural Plasticity. *Front. Neuroanat.* 10: 75
- Feldman ML. 1984. Morphology of the neocortical Pyramidal neuron. In *Cerebral Cortex*, ed. A Peters, EG Jones, pp. 123-200. New York: Plenum Press
- Franks KM, Bartol TM, Jr., Sejnowski TJ. 2002. A Monte Carlo model reveals independent signaling at central glutamatergic synapses. *Biophysical journal* 83: 2333-48
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y. 2004a. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *The Journal of comparative neurology* 468: 86-95
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y. 2004b. Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. *Neuroscience* 125: 615-23
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE, Rossi M, Parshall RF. 1993. Structural synaptic correlate of long-term potentiation: formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones. *Hippocampus* 3: 435-45

- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L. 1987. Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections. *Brain research* 423: 179-88
- Gulledge AT, Carnevale NT, Stuart GJ. 2012. Electrical advantages of dendritic spines. *PLoS One* 7: e36007
- Hadzic M, Jack A, Wahle P. 2017. Ionotropic glutamate receptors: Which ones, when, and where in the mammalian neocortex. *Journal of Comparative Neurology* 525: 976-1033
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12: 2685-705
- Helmstaedter M. 2013. Cellular-resolution connectomics: challenges of dense neural circuit reconstruction. *Nat Methods* 10: 501-7
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rozsa B, Kulik A, et al. 2012. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature neuroscience* 15: 988-97
- Houser CR, Vaughn JE, Hendry SHC, Jones EG, Peters A. 1984. GABA neurons in cerebral cortex. Functional Properties of Cortical Cells. In *Cerebral Cortex*, ed. A Peters, EG Jones, pp. 63-89. New York: Plenum Press
- Hsu A, Luebke JI, Medalla M. 2017. Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. *The Journal of comparative neurology* 525: 2175-91
- Ikegaya Y, Sasaki T, Ishikawa D, Honma N, Tao K, et al. 2013. Interpyramid spike transmission stabilizes the sparseness of recurrent network activity. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 23: 293-304
- Jones DG, Calverley RK. 1991. Perforated and non-perforated synapses in rat neocortex: three-dimensional reconstructions. *Brain research* 556: 247-58
- Jones DG, Devon RM. 1978. An ultrastructural study into the effects of pentobarbitone on synaptic organization. *Brain research* 147: 47-63
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J. 2010. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci* 33: 121-9
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26: 360-8
- Kharazia VN, Weinberg RJ. 1999. Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *The Journal of comparative neurology* 412: 292-302
- Kneussel M, Hausrat TJ. 2016. Postsynaptic Neurotransmitter Receptor Reserve Pools for Synaptic Potentiation. *Trends Neurosci* 39: 170-82
- Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. 2008. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 2959-64
- Lefort S, Tómm C, Floyd Sarria JC, Petersen CC. 2009. The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex. *Neuron* 61: 301-16
- Li TP, Blanpied TA. 2016. Control of Transmembrane Protein Diffusion within the Postsynaptic Density Assessed by Simultaneous Single-Molecule Tracking and Localization Microscopy. *Frontiers in synaptic neuroscience* 8: 19
- Lisman J. 2017. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372
- Major G, Larkum ME, Schiller J. 2013. Active properties of neocortical pyramidal neuron dendrites. *Annu Rev Neurosci* 36: 1-24
- Markram H, Müller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M, et al. 2015. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell* 163: 456-92
- Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience* 4: 1086-92
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GCR, Kasai H. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429: 761-66
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR. 2010. Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8836-41
- Medvedev NI, Popov VI, Dallerac G, Davies HA, Laroche S, et al. 2010. Alterations in synaptic curvature in the dentate gyrus following induction of long-term potentiation, long-term depression, and treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist CPP. *Neuroscience* 171: 390-7
- Merchan-Perez A, Rodríguez JR, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J. 2009. Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front. Neuroanat.* 3: 14
- Merchan-Perez A, Rodríguez JR, Gonzalez S, Robles V, Defelipe J, et al. 2014. Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 24: 1579-88
- Montes J, Pena JM, DeFelipe J, Herreras O, Merchan-Perez A. 2015. The influence of synaptic size on AMPA receptor activation: a Monte Carlo model. *PLoS One* 10: e0130924
- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez J-R, Defelipe J, Rodríguez A, Merchan-Perez A. 2011. Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front. Neuroanat.* 5: 18
- Morales J, Rodríguez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchan-Perez A. 2013. Characterization and extraction of

- the synaptic apposition surface for synaptic geometry analysis. *Front. Neuroanat.* 7: 10
- Morgan JL, Lichtman JW. 2013. Why not connectomics? *Nat Methods* 10: 494-500
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. 1998. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21: 545-59
- Paxinos G, Watson C. 2007. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press
- Peters A, Palay SL, Webster HD. 1991. *The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells*. New York: Oxford University Press. 528 pp.
- Rodriguez-Moreno J, Rollenhagen A, Arlandis J, Santuy A, Merchan-Perez A, et al. 2017. Quantitative 3D ultrastructure of synaptic boutons from the 'lemniscal' ventral posteromedial thalamic nucleus in mouse barrel cortex. *Submitted*
- Rollenhagen A, Klook K, Satzler K, Qi G, Anstötz M, et al. 2015. Structural determinants underlying the high efficacy of synaptic transmission and plasticity at synaptic boutons in layer 4 of the adult rat 'barrel cortex'. *Brain structure & function* 220: 3185-209
- Santuy A, Rodriguez J, DeFelipe J, Merchan-Perez A. 2017. Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the juvenile rat somatosensory cortex. *Submitted*
- Schikorski T, Stevens CF. 1997. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17: 5858-67
- Schikorski T, Stevens CF. 1999. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4107-12
- Schüz A, Palm G. 1989. Density of neurons and synapses in the cerebral cortex of the mouse. *The Journal of comparative neurology* 286: 442-55
- Silberberg G. 2008. Polysynaptic subcircuits in the neocortex: spatial and temporal diversity. *Current opinion in neurobiology* 18: 332-7
- Smith SJ. 2007. Circuit reconstruction tools today. *Current opinion in neurobiology* 17: 601-8
- Song S, Sjöström PJ, Reigl M, Nelson S, Chklovskii DB. 2005. Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits. *PLoS biology* 3: e68
- Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinivik E, Ottersen OP. 1999. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature neuroscience* 2: 618-24
- Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, et al. 2009. Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29: 12896-908
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Povilaitis P, Parisi L, Müller D. 2001. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21: 6245-51
- White EL. 2007. Reflections on the specificity of synaptic connections. *Brain research reviews* 55: 422-9
- White EL, Keller A. 1989. *Cortical Circuits: Synaptic Organization of the Cerebral Cortex. Structure, Function and Theory*. Boston: Birkhäuser.

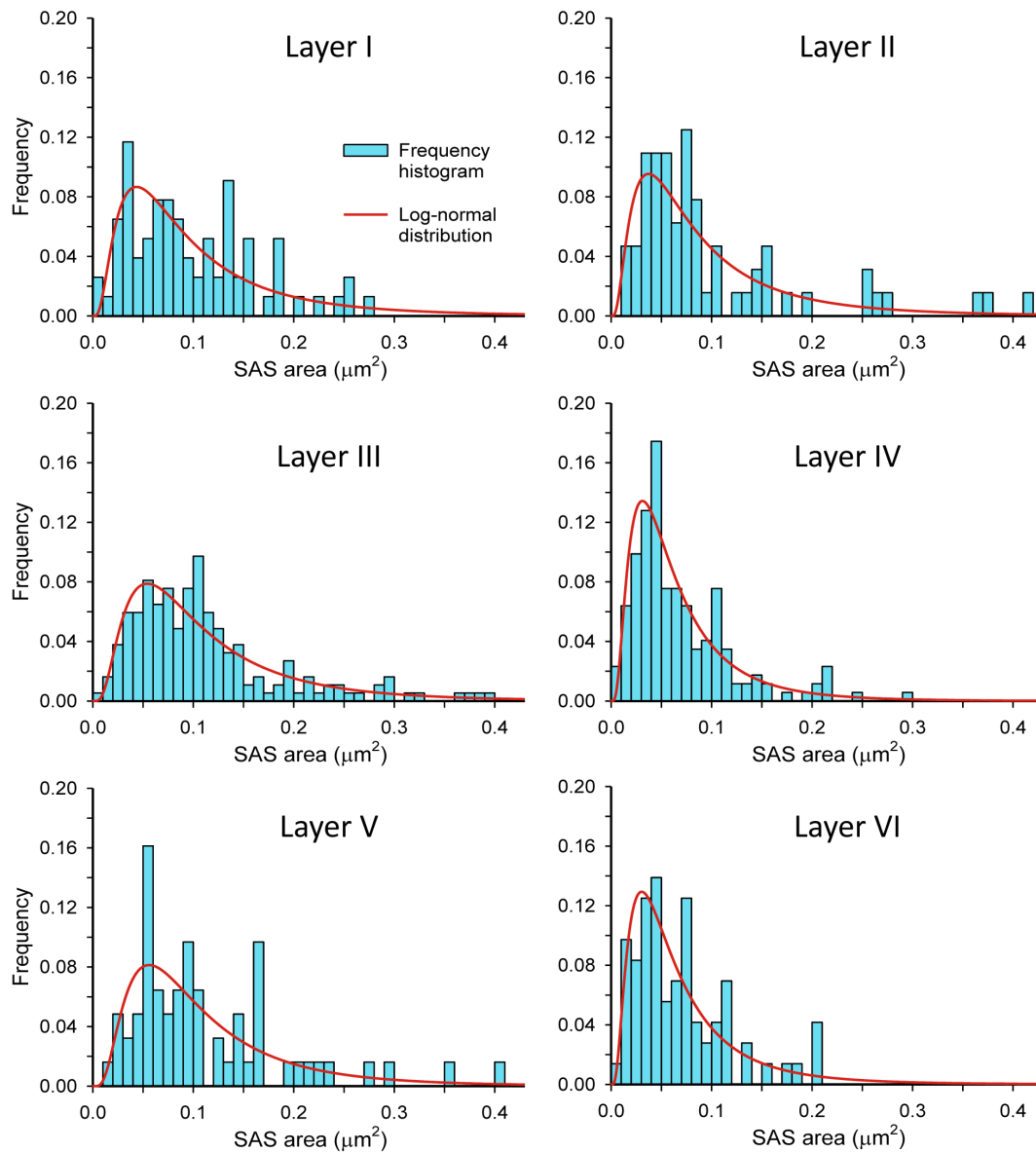
Supplementary Materials

Surface area of asymmetric synapses



Supplementary Figure 1. Frequency histograms of SAS areas of asymmetric synapses. Frequency histograms of SAS areas (blue bars) in the six cortical layers are represented for asymmetric synapses. The best-fit distributions representing the theoretical probability density functions (red traces) have been represented with their corresponding frequency histograms.

Surface area of symmetric synapses



Supplementary Figure 2. Frequency histograms of SAS areas of symmetric synapses. Frequency histograms of SAS areas (blue bars) in the six cortical layers are represented for symmetric synapses. The best-fit distributions representing the theoretical probability density functions (red traces) have been represented with their corresponding frequency histograms.

SAS area, asymmetric synapses						
I						
II	0.001					
III	0.001	<0.001				
IV	<0.001	0.916	<0.001			
V	0.271	<0.001	0.023	<0.001		
VI	0.102	0.114	<0.001	0.070	0.001	
	I	II	III	IV	V	VI

Supplementary Table 1. Pair-wise comparisons of SAS areas of asymmetric synapses in the six cortical layers. (Mann-Whitney U tests, p values).

SAS area, symmetric synapses						
I						
II	0.094					
III	0.394	0.002				
IV	<0.001	0.031	<0.001			
V	0.490	0.018	0.905	<0.001		
VI	0.002	0.143	<0.001	0.767	<0.001	
	I	II	III	IV	V	VI

Supplementary Table 2. Pair-wise comparisons of SAS areas of symmetric synapses in the six cortical layers. (Mann-Whitney U tests, p values).

SAS perimeter, asymmetric synapses						
I						
II	0.002					
III	<0.001	<0.001				
IV	<0.001	0.007	<0.001			
V	0.035	<0.001	0.019	<0.001		
VI	<0.001	0.002	<0.001	0.364	<0.001	
	I	II	III	IV	V	VI

Supplementary Table 3. Pair-wise comparisons of SAS perimeters of asymmetric synapses in the six cortical layers. (Mann-Whitney U tests, p values).

SAS perimeter, symmetric synapses						
I						
II	0.264					
III	0.054	0.001				
IV	<0.001	0.001	<0.001			
V	0.205	0.021	0.643	<0.001		
VI	<0.001	0.003	<0.001	0.818	<0.001	
	I	II	III	IV	V	VI

Supplementary Table 4. Pair-wise comparisons of SAS perimeters of symmetric synapses in the six cortical layers. (Mann-Whitney U tests, p values).

		I	II	III	IV	V	VI
AS	Head	70038.63± 64368.04	61971.49± 58425.41	72037.10± 55801.06	54188.34± 42249.21	70150.59± 58353.25	55648.73± 44776.53
	Neck	103063.38± 10527.98	53852.41± 44454.46	49812.85± 35411.12	41208.40± 21993.39	39873.24± 25305.98	67045.54± 55130.77
	Shaft	80627.22± 6678.53	101221.57± 07565.68	82535.49± 65411.30	55984.94± 43261.63	82678.52± 62613.34	79990.50± 68931.78
	Total	72186.56± 65588.26	65311.03± 64969.21	73008.16± 57067.96	54156.00± 42060.60	71872.80± 59018.08	60743.90± 51524.59
SS	Head	68036.63± 54252.39	70474.22± 38203.55	89635.26± 36198.99	53849.93± 30098.95	80338.44± 30859.41	52297.75± 31587.56
	Neck	69898.72± 30127.63	104035.56± 90166.90	119487.75± 51082.26	38232.54± 18543.54	46303.32± 21050.11	67949.60± 28090.83
	Shaft	127444.73± 85018.96	111291.57± 99956.10	123539.08± 98341.62	83268.35± 61569.71	125797.54± 89305.41	80407.19± 56912.61
	Total	68036.63 ± 54252.39	105884.18± 93746.19	119761.84± 92751.64	70802.08± 53328.64	115572.79± 84611.46	72991.96± 51387.60
All (AS + SS)	Head	69968.79± 63988.78	62034.70± 58289.84	72228.62± 55647.67	54168.87± 41633.86	70278.21± 58082.77	55536.45± 44372.19
	Neck	83554.76± 73312.96	69534.64± 63738.58	58522.21± 43746.23	40577.15± 21068.90	41357.10± 23708.58	67303.84± 47817.15
	Shaft	97719.33± 77025.13	104691.06± 04690.54	96832.14± 80762.90	65396.66± 51868.32	94787.29± 73417.34	80110.88± 65476.99
	Total	76474.08± 68194.68	67550.74± 67453.68	76721.93± 61947.19	56217.61± 43932.18	75297.57± 62438.62	62021.17± 51598.67

Supplementary Table 5. SAS areas (mean ± sem) of asymmetric and symmetric synapses (AS and SS, respectively) located on the head and neck of spines, and on dendritic shafts, in the six cortical layers (I-VI).

	AS				SS			
	Mean SAS area ± sem (nm ²)	n	μ	σ	Mean SAS area ± sem (nm ²)	n	μ	σ
Macular	59271.15 ± 595.95	5836	10.73	0.79	86903.65 ± 2816.34	572	11.11	0.76
Horseshoe- shaped	146689.44 ± 6756.82	136	11.75	0.57	155387.11 ± 16435.88	35	11.73	0.70
Perforated	175955.57 ± 5842.02	283	11.91	0.63	185606.83 ± 30594.69	24	11.84	0.76
Horseshoe and Perforated	166456.30 ± 4559.20	419	11.86	0.62	167679.88 ± 15771.21	59	11.45	1.07

Supplementary Table 6. Mean synaptic apposition surface (SAS) area (nm² ± sem), number of synapses analyzed (n), and the location (μ) and scale (σ) of the best-fit log-normal distributions of macular, horseshoe-shaped and perforated synapses. AS: asymmetric synapses; SS: symmetric synapses.

En Madrid, a 2 de noviembre de 2017